UNTERSUCHUNGEN ZUR BEEINFLUSSUNG DER INSULINSEKRETION LANGERHANSSCHER INSELN DER RATTE DURCH EXOGENE THIOLE

Bedeutung der Cystein-Komponente

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
KARL–HEINZ HEHL
aus Rottweil a. N.

1984

UNTERSUCHUNGEN ZUR BEEINFLUSSUNG DER INSULINSEKRETION LANGERHANSSCHER INSELN DER RATTE DURCH EXOGENE THIOLE

Bedeutung der Cystein-Komponente

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
KARL–HEINZ HEHL
aus Rottweil a. N.

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 22. November 1984

Dekan: Prof. Dr. K.-A. Kovar

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.P.T. Ammon
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Reinhard

Meiner Frau

und

meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536512_0010

Die vorliegende Arbeit wurde im Mai 1981 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im Februar 1984 abgeschlossen.

Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon
danke ich für die Überlassung des Themas, seine freundliche Unterstützung und stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Weiter möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Ammon für die ständige Diskussionsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit bedanken.

A B K Ü R Z U N G E N

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
6-AN	6-Aminonicotinamid
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
cAMP	cyclisches Adenosin-3'.5'-monophosphat
cpm	counts per minute
DIP	Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazid)
DTNP	5.5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)
E	Einheiten
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
γ-GTP	γ-Glutamyl-Transpeptidase
h	Stunden
i.p.	intraperitoneal
IRI	immunoreaktives Insulin
KRB-Lsg.	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung
Min., min	Minuten
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, reduziert
n.s.	nicht signifikant
p	Probability
p-CMB	para-Chlormercuribenzoat
p-CMBS	para-Chlormercuribenzolsulfonsäure
PEP	Phosphoenolpyruvat
PPS	Pentosephosphatshunt
r	Korrelationskoeffizient
RIA	Radioimmunoassay
RSA	Rinderserumalbumin
s.c.	subkutan
SEM	standard error of the mean
t-BHP	teritäres Butylhydroperoxid
TPOR	Thiol-Proteindisulfid-Oxidoreduktase
U/min	Umdrehung/Minute

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Stand der Forschung	1
1.1.1	Mechanismus der Glucose-induzierten Insulinsekretion	1
1.1.2	Glucosemetabolismus und Insulinsekretion	10
1.1.3	Thiole und Insulinsekretion	16
1.1.4	Status und Funktionen von Glutathion und Cystein	24
1.2	Fragestellung	30
2.	MATERIAL	33
2.1	Versuchstiere	33
2.2	Geräte	33
2.3	Chemikalien	34
2.4	Elektrolytlösungen	35
2.4.1	Hanks'Lösung	35
2.4.2	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung	35
2.5	Inkubationsmedien	37
2.5.1	Vorinkubationsmedium	37
2.5.2	Hauptinkubationsmedium	37
2.6	Ellmans Reagens	37
2.6.1	Phosphat-Puffer für Testlösung	38
2.7	Puffer für Ratteninsulinstandard	38
3.	METHODIK	39
3.1	Methode zur Gewinnung und Isolierung der Langerhansschen Inseln	39
3.1.1	Pankreatektomie	39
3.1.2	Isolierung der Langerhansschen Inseln	39

3.2	Vorinkubation	41
3.3	Hauptinkubation	41
3.3.1	Änderungen in der experimentellen Anordnung im Vergleich zum bisher angewandten Versuchsaufbau	41
3.3.1.1	Reaktions- und Inkubationsgefäße	43
3.3.1.2	Ablauf der Hauptinkubation	46
3.3.2	Zur Wahl der Glucosekonzentrationen	47
3.3.3	Zur Wahl des geeigneten Inkubationszeitraumes	47
3.3.4	Verlauf der durch Glucose (11.1 mM) induzierten Insulinsekretion nach der ersten Phase der Hauptinkubation	49
3.3.5	Verlauf der Insulinsekretion bei stimulatorischer (11.1 mM) und substimulatorischer (2.8 mM) Glucosekonzentration in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei Wechsel des Mediums nach 30 Min.	53
3.3.6	Schlußfolgerungen	56
3.4	Radioimmunologische Bestimmung von Insulin	57
3.4.1	Einfluß von Thiolen auf den Radioimmunoassay	57
3.4.2	Durchführung der Bestimmung	57
3.4.3	Auswertung	59
3.5	Bestimmung der freien SH-Gruppe im Inkubationsmedium	60
3.6	Statistische Auswertung	61
4.	ERGEBNISSE	62
4.1	Glutathion reduziert (GSH)	62
4.1.1	Konzentrationsänderungen im Inkubationsmedium	62
4.1.2	Einfluß auf den Verlauf der Eichgeraden des Insulin-Radioimmunoassays	62

4.1.3	Einfluß von GSH auf die Insulinsekretion bei stimulatorischer (11.1 mM) und substimulatorischer (2.8 mM) Glucosekonzentration	66
4.2	N-Acetyl-L-cystein	70
4.2.1	Konzentrationsänderungen im Inkubationsmedium	70
4.2.2	Einfluß auf den Verlauf der Eichgeraden des Insulin-Radioimmunoassays	70
4.2.3	Einfluß von N-Acetyl-L-cystein auf die Insulinsekretion bei stimulatorischer (11.1 mM) und substimulatorischer (2.8 mM) Glucosekonzentration	74
4.3	L-Cystein-methylester	77
4.3.1	Konzentrationsänderungen im Inkubationsmedium	77
4.3.2	Einfluß auf den Verlauf der Eichgeraden des Insulin-Radioimmunoassays	77
4.3.3	Einfluß von L-Cystein-methylester auf die Insulinsekretion bei stimulatorischer (11.1 mM) und substimulatorischer (2.8 mM) Glucosekonzentration	81
4.4	L-Cystein-ethylester	84
4.4.1	Konzentrationsänderungen im Inkubationsmedium	84
4.4.2	Einfluß auf den Verlauf der Eichgeraden des Insulin-Radioimmunoassays	84
4.4.3	Einfluß von L-Cystein-ethylester auf die Insulinsekretion bei stimulatorischer (11.1 mM) und substimulatorischer (2.8 mM) Glucosekonzentration	88
4.5	Natrium-2-mercaptoethansulfonat (Mesna)	91
4.5.1	Konzentrationsänderungen im Inkubationsmedium	91
4.5.2	Einfluß auf den Verlauf der Eichgeraden des Insulin-Radioimmunoassays	91
4.5.3	Einfluß von Mesna auf die Insulinsekretion bei stimulatorischer (11.1 mM) und substimulatorischer (2.8 mM) Glucosekonzentration	95

4.6	2-Mercaptopropionylglycin (Tiopronin)	98
4.6.1	Konzentrationsänderungen im Inkubationsmedium	98
4.6.2	Einfluß auf den Verlauf der Eichgeraden des Insulin-Radioimmunoassays	98
4.6.3	Einfluß von Tiopronin auf die Insulinsekretion bei stimulatorischer (11.1 mM) und substimulatorischer (2.8 mM) Glucosekonzentration	102
4.7	Vergleich der Thiole in Bezug auf die Stabilität der SH-Gruppe unter Inkubationsbedingungen	105
4.8	Vergleich der maximal synergistischen Effekte der untersuchten Thiole auf die durch Glucose (11.1 mM) induzierte Insulinsekretion	106
5.	DISKUSSION	107
5.1	Glutathion und Zellmembran-Thiolstatus	107
5.1.1	Beeinflussung des intrazellulären GSH-Gehaltes	108
5.1.1.1	Zufuhr von Vorstufen der GSH-Biosynthese	108
5.1.1.2	Applikation von intaktem GSH	112
5.1.1.3	Intrazelluläre Freisetzung von GSH	113
5.1.1.4	Zusammenfassende Bewertung	114
5.1.2	Direkte Beeinflussung des Zellmembran-Thiolstatus durch exogene Thiole	115
5.2	Pharmakologische und therapeutische Aspekte der untersuchten Thiole	116
5.3	Einfluß der untersuchten Thiole auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion	120
5.3.1	Glutathion reduziert (GSH)	120
5.3.2	N-Acetyl-L-cystein	121
5.3.3	L-Cystein-methyl/-ethylester	122
5.3.4	Mesna und Tiopronin	124
5.4	Beziehungen zwischen chemischer Struktur und biologischem Effekt	125
5.4.1	Affinität und biologische Aktivität	127

5.5 Mögliche Lokalisation der Thiolwirkung 128

6. ZUSAMMENFASSUNG 132

6.1 Fragestellung 132

6.2 Versuchsergebnisse 133

6.3 Schlußfolgerungen 135

LITERATURVERZEICHNIS 136

1. E I N L E I T U N G

1.1 Stand der Forschung

1.1.1 Mechanismus der Glucose-induzierten Insulinsekretion

Die Einführung einer Reihe von Methoden zur Isolierung lebensfähiger Langerhansscher Inseln von verschiedenen Säugetieren (HELLERSTRÖM, 1964; MOSKALEWSKI, 1965; KEEN et al., 1965; LACY u. KOSTIANOVSKY, 1967) ermöglichte intensive Untersuchungen des Mechanismus, durch den Glucose - der wichtigste und potenteste physiologische Initiator - die Biosynthese und Sekretion von Insulin stimuliert.
Eine Grundvoraussetzung für die durch Glucose und andere Initiatoren stimulierbare Insulinsekretion war die Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} (GRODSKY u. BENNETT, 1966; MILNER u. HALES, 1968; CURRY et al., 1968a).
Die von CURRY et al. (1968b) am Modell des perfundierten Ratten-Pankreas entdeckte biphasische Sekretionsantwort auf Glucosestimulierung zeigte in beiden Phasen, sowohl im initialen, kurzfristigen Anstieg wie auch in der langsam sich entwickelnden zweiten Sekretionssteigerung, eine Abhängigkeit von der extrazellulären Ca^{2+}-Konzentration (GRODSKY et al., 1968).
Diese Erkenntnisse deuteten bereits zum damaligen Zeitpunkt auf eine Schlüsselrolle von Ca^{2+} im 'Stimulus-secretion coupling' hin. Inzwischen ist unbestritten, daß die Erhöhung der freien Ca^{2+}-Konzentration im Cytoplasma der B-Zelle als 'trigger' des Sekretionsmechanismus angesehen werden muß (MALAISSE-LAGAE u. MALAISSE, 1971; HELLMAN et al., 1976; MALAISSE, 1977; FRANKEL et al., 1978).

Zur Klärung der Frage, wie es unter Glucoseeinfluß zur Erhöhung der cytoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration in der B-Zelle kommt, wurden von RANDLE et al. (1968) zwei verschiedene Hypothesen vorgeschlagen.

Im 'Regulator-site-model' wurde ein membrangebundener Glucoserezeptor postuliert, der in der Lage wäre, Glucose zu binden, um dadurch die Membranpermeabilität so zu verändern, daß es zum Einstrom von Ca^{2+} und in der Folge zur Exocytose kommen müßte. Die Befunde zur Stützung dieser Hypothese erwiesen sich jedoch als zu schwach, bruchstückartig und in sich widersprechend. Leider konnte dadurch ein möglicher direkter Effekt von Glucose oder anderen Stimulatoren der Insulinsekretion nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die Grundaussage der 'Substrate-site'-Hypothese ist folgende: Der Metabolismus von Glucose und anderen Zuckern in der ß-Zelle stellt eines oder mehrere intrazelluläre Signale zur Verfügung. Diese Signalmetaboliten verursachen ein Ansteigen der cytoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration, was - wie bereits erwähnt - die Sekretion von Insulin nach sich zieht. Diese Hypothese hat ihre experimentelle Grundlage in Untersuchungen von GRODSKY et al. (1963) und von COORE u. RANDLE (1964), in denen gezeigt werden konnte, daß nur solche Zucker, die in der B-Zelle metabolisiert werden, auch in der Lage sind, als Initiatoren der Insulinsekretion zu wirken. Eine detaillierte Darstellung dieser Zusammenhänge erfolgt unter 1.1.2.

Die Erkenntnisse über die Stoffwechselereignisse vom Glucosereiz über den Metabolismus bis zur Exocytose wurden in einem Schema (Abb. 1.1) von ASHCROFT (Review, 1980) sehr anschaulich zusammengefaßt.

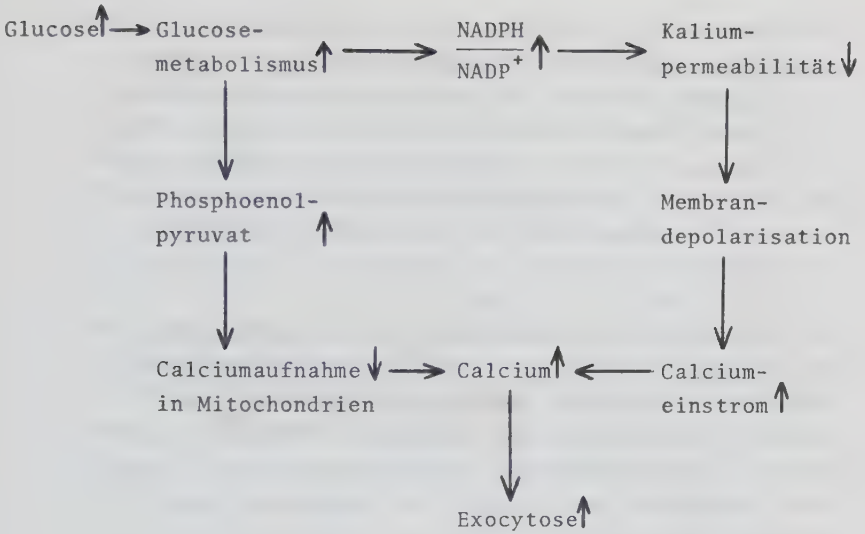


Abb. 1.1: Modell der Regulationsmechanismen bei der durch Glucose induzierten Insulinsekretion. Nach ASHCROFT (1980) führt der Anstieg der Glucosekonzentration über zwei Wege zu einer erhöhten Ca^{2+}-Konzentration im Cytoplasma:

1. über das Ansteigen des Phosphoenolpyruvats und der nachfolgenden Hemmung der Ca^{2+}-Aufnahme in Mitochondrien
2. über die Depolarisierung der Cytoplasmamembran und dem daraus resultierenden verstärkten Ca^{2+}-Einstrom.

Eine extrazelluläre Glucosekonzentrationserhöhung verursacht eine verstärkte Metabolisierung der ins Zellinnere transportierten Glucose. Eine Konsequenz dieses verstärkten Metabolismus ist ein Ansteigen des NADPH/NADP-Quotienten. Diese Verschiebung des Redoxzustandes der zellulären Pyridinnukleotide hat ein Abfallen der Membran-K^+-Permeabilität zur Folge (HENQUIN, 1978a, 1980).

Die Zellmembran depolarisiert und bei einem bestimmten Schwellenwert öffnen sich voltabhängige Calciumkanäle (MATTHEWS u. SAKAMOTO, 1975; MEISSNER, 1976; HENQUIN, 1977 und 1978b; HENQUIN u. MEISSNER, 1978). Ein verstärkter Ca^{2+}-Influx trägt zur bereits erwähnten Ca^{2+}-Konzentrationserhöhung bei, wodurch der Vorgang der Exocytose ausgelöst wird.

Eine weitere Konsequenz eines erhöhten extrazellulären Glucoseangebotes und des daraus resultierenden verstärkten Glucosestoffwechsels ist ein Anstieg des Phosphoenolpyruvats (PEP), verursacht durch eine gesteigerte Glykolyse (SUGDEN u. ASHCROFT, 1977). Eine erhöhte Konzentration von PEP trägt zur Aufrechterhaltung einer erhöhten Ca^{2+}-Konzentration im Cytoplasma bei, indem die Ca^{2+}-Aufnahme in die Mitochondrien gehemmt wird (SUGDEN u. ASHCROFT, 1978).

Eine modulierende Rolle in der Regulation der Insulinsekretion wird dem cAMP-System zugesprochen. Durch ein Ansteigen des Ca^{2+}-Influxes nach Glucosereiz wird die Adenylatcyclase stimuliert und dadurch die Bildung von cAMP katalysiert (CHARLES et al., 1975; HELLMAN, 1976). Der angestiegende cAMP-Spiegel kann aufrechterhalten oder sogar noch weiter gesteigert werden durch die bereits

erwähnte Erhöhung des Phosphoenolpyruvats, das ebenfalls zur Aktivierung der Adenylatcyclase beiträgt (CAPITO u. HEDESKOV, 1977). Die Zunahme des cAMP zeigt ähnlich der Insulinsekretion einen biphasischen Verlauf (ZAWALICH et al., 1975).
Hohe cAMP-Spiegel beeinflussen die Verteilung von intrazellulärem Ca^{2+} durch Hemmen der aktiven Ca^{2+}-Aufnahme in verschiedenen Zellorganellen (HOWELL u. MONTAGUE, 1975; FORMBY et al., 1976; SEHLIN, 1976) und/oder möglicherweise auch durch Freisetzung von Ca^{2+} aus Mikrosomen (BRISSON et al., 1972; HAHN et al., 1980).
Eine zweite wichtige Funktion von erhöhtem cAMP besteht in der Phosphorylierung von Proteinen durch Aktivierung einer cAMP-abhängigen Proteinkinase (SUGDEN et al.,1979a).

Cyclisches Adenosinmonophosphat wird heute als potenzierendes Signal der Insulinsekretion angesehen und die Enzyme Adenylatcyclase und Phosphodiesterase stellen ein System zur Erkennung von Modulatoren bzw. Potentiatoren der Insulinfreisetzung dar. Dadurch sind Hormone (z.B. Glucagon, Prostaglandine) und Pharmaka (ß-Adrenergika) durch Stimulation der Adenylatcyclase in der Lage, die Insulinsekretion zu potenzieren (MALAISSE et al., 1967; SHARP et al., 1975). Auch Methylxanthine (z.B. Theophyllin, Coffein, 3-isobutyl-1-methylxanthin), die die Phosphodiesterase inhibieren und so zur Erhöhung des cAMP-Spiegels führen, verstärken die Glucose-induzierte Insulinsekretion (ASHCROFT et al., 1972a; SAMS u. MONTAGUE, 1972).

Der mögliche Weg, über den das Signal für die Initierung der Insulinsekretion umgesetzt wird in den Prozeß der Granulabewegung und der nachfolgenden Exocytose, wurde von HOWELL u. TYHURST (Review, 1982) beschrieben.

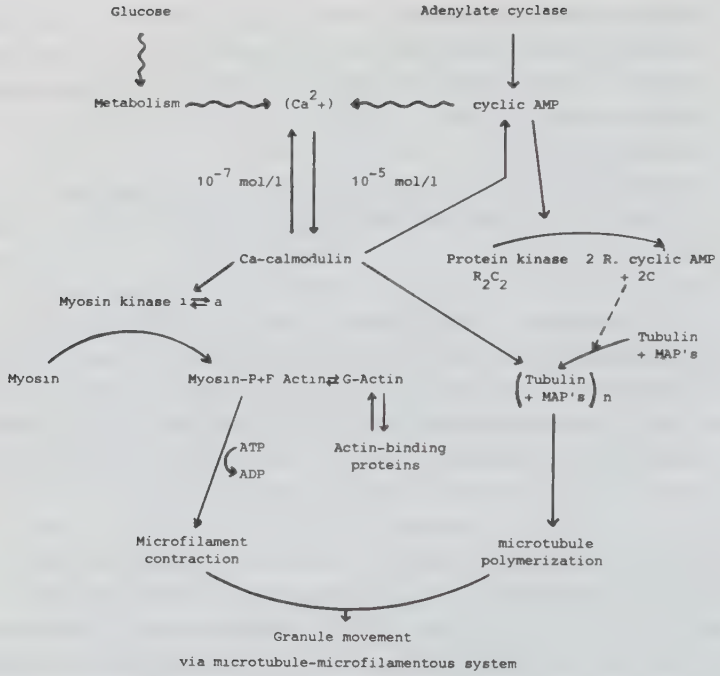


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Zusammenhänge zwischen Ca^{2+}, Calmodulin, Tubulin, Actin und Myosin bei der Auslösung der Granulabewegungen (HOWELL u. TYHURST, 1982):

1. Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration hat vermehrte Bildung von Ca-Calmodulin zur Folge.

2. Der Komplex fördert zusammen mit einer cAMP-abhängigen Proteinkinase die Polymerisation des Tubulins zu Mikrotubuli.

3. Ca-Calmodulin aktiviert eine Myosinkinase. Phosphoryliertes Myosin und filamentäres Actin verursachen Mikrofilament-Kontraktion.

4. Actomyosin-Kontraktion erleichtert Bewegung der Granula zur Zellmembran entlang der möglicherweise durch Mikrotubuli vorgezeichneten Bahnen.

In Abb. 1.2 wird eine Verbindung zwischen der erhöhten cytosolischen Ca^{2+}-Konzentration und den Granulabewegungen hergestellt. Es werden außerdem mögliche Beziehungen zwischen Calcium, Tubulin, Actin und Myosin für die Auslösung der Granulabewegungen postuliert.

Das Ansteigen der cytosolischen Ca^{2+}-Konzentration durch die Metabolisierung der Glucose einerseits und/oder durch Stimulierung des cAMP-Systems andererseits führt zur Bindung von Ca^{2+} an Calmodulin, ein in Inselzellen als Ca-abhängiges Regulatorprotein identifizierter Calciumrezeptor (SUGDEN et al., 1979b; HUTTON et al., 1981). Inselzellen weisen sowohl cytoplasmatisches als auch membrangebundenes Calmodulin auf (TOMLINSON et al.,1982). Die Verwendung von Trifluoperazin, einem spezifischen Inhibitor der Calcium-bindenden Funktion des Calmodulins (WEISS et al., 1980), führte zur Aufklärung seiner Rolle im Insulin-Sekretions-Prozeß. So hemmt das Phenothiazin-Derivat die durch Glucose (KRAUSZ et al., 1980; VALVERDE et al., 1981), Leucin (GAGLIARDINO et al., 1980) und Tolbutamid (HENQUIN, 1981) induzierte Insulinsekretion.

Die Aktivitäten der Adenylatcyclase (VALVERDE et al., 1979) und der Phosphodiesterase (SUGDEN et al., 1981) konnten in Langerhansschen Inseln von Ratten durch Ca^{2+}-Calmodulin erhöht und durch Trifluoperazin verringert werden. Interessanterweise steuert also das gleiche Aktivatorprotein (Calmodulin) sowohl das Enzym für den Aufbau wie auch das für den Abbau der gleichen Substanz (cAMP). Dies funktioniert vermutlich deshalb so elegant, weil die Adenylatcyclase zellmembranständig ist, während die calciumabhängige Phosphodiesterase im Cytoplasma gelöst vorliegt. Durch die Zellmembran einströmendes Calcium bindet sich daher zunächst an membrangebundenes

Calmodulin und aktiviert die Adenylatcyclase. Erst danach erreichen die Calciumionen auch die cytoplasmatischen Calmodulinmoleküle, so daß nun die Phosphodiesterase aktiviert werden kann. Die Calmodulin-abhängige Phosphodiesterase begrenzt dadurch die Effekte der Stimulatoren, die über eine Aktivitätserhöhung der Adenylatcyclase wirken. Dies würde den nur vorübergehenden Anstieg des cAMP-Spiegels in Inseln unter Glucoseeinfluß erklären. Ebenfalls durch Verwendung von Trifluoperazin konnte eine Calcium-Calmodulin abhängige Proteinkinase (cAMP-unabhängig) identifiziert werden (GAGLIARDINO et al., 1980; SCHUBERT et al., 1980).
Diese Kenntnisse der Eigenschaften und Funktionen des Calmodulins in der B-Zelle führten zum Verständnis molekularer Mechanismen, welche der zellulären Regulation durch Calcium zugrundeliegen. Dieser Calmodulin-abhängigen Regulation unterliegen, außer dem Stoffwechsel der cyclischen Nukleotide, die Phosphorylierung endogener Proteine und möglicherweise auch Kontraktionsvorgänge im Rahmen der Granulabewegungen.

Man geht davon aus, daß das Ca^{2+}-Calmodulin direkt oder durch Proteinphosphorylierung in der Lage ist, das Mikrotubulus/Mikrofilament-System zu beeinflussen. LACY et al. vermuteten bereits 1968 eine Beteiligung eines kontraktilen Mikrotubulus/Mikrofilamentsystems an der Bewegung der Insulingranula. Nachfolgende Untersuchungen erhärteten diese Vermutung. Substanzen, die die Stabilität der Mikrotubuli beeinträchtigen, hemmen die Glucosestimulierte Sekretion von Insulin (MALAISSE et al.,1971). Während der Stimulation isolierter Inseln durch Glucose oder 3-isobutyl-1-methylxanthin werden Mikrotubuli vermehrt gebildet (MONTAQUE et al., 1976).
Mikrotubuli scheinen eine Rolle im intrazellulären Trans-

port der Granula zur Zellmembran zu spielen (LACY et al., 1972; MALAISSE et al., 1975), während von den Mikrofilamenten die erforderliche Energie geliefert wird (MALAISSE et al., 1972).

Nach HOWELL u. TYHURST (1982) kommt es durch Bildung des Ca-Calmodulins (Abb. 1.2) zur Förderung der Tubulinpolymerisation zu Mikrotubuli, möglicherweise in Verbindung mit einer verstärkten Phosphorylierung des Tubulins oder mikrotubulusassozierter Proteine (MAP's) durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase. Eine weitere Folge der Bindung von Ca^{2+} an Calmodulin ist die Phosphorylierung des Myosins durch Aktivierung der Calmodulinabhängigen Myosin-Light-Chain-Kinase. Die nachfolgende ATP-abhängige Actomyosin-Kontraktion erleichtert die Bewegung der Granula entlang der möglicherweise durch Mikrotubuli vorgezeichneten Bahnen bis nahe an die Zellmembran.

Durch Verschmelzen der Granula mit der Zellmembran kommt es zur Exocytose (LACY, 1961).

1.1.2 Glucosemetabolismus und Insulinsekretion

Der Metabolismus von Glucose und anderen stimulierenden Zuckern und Zuckerderivaten in der B-Zelle spielt eine entscheidende Rolle sowohl für die Auslösung der Sekretion als auch für die Biosynthese von Insulin.

Aus einer umfassenden Anzahl von Zuckern und Zuckerderivaten (ASHCROFT, 1980) können nur Glucose selbst, Mannose (ASHCROFT et al., 1973) und N-Acetylglucosamin (WILLIAMS u. ASHCROFT, 1978) in B-Zellen von Inseln metabolisiert werden. Dies sind auch die einzigen Zucker, die in der Lage sind, Biosynthese und Sekretion von Insulin auszulösen (ASHCROFT et al., 1972b, 1978).

Fructose wird zwar ebenfalls metabolisiert, allerdings nur zu einem beträchtlich geringeren Anteil als Glucose oder Mannose (ZAWALICH et al., 1979), so daß Insulinsekretion (ASHCROFT et al., 1972b) und -biosynthese (ASHCROFT et al., 1978) nur in Anwesenheit einer substimulatorischen Glucosekonzentration ausgelöst werden können.

Auch die Triosen D-Glycerinaldehyd und Dihydroxyaceton, die nach Phosphorylierung als Substrate in die Glykolyse der B-Zelle eintreten, stimulieren die Sekretion (ASHCROFT et al., 1973; HELLMAN et al., 1974a; JAIN et al., 1975; MALAISSE et al., 1976a) und Biosynthese von Insulin (JAIN et al., 1975; ASHCROFT et al., 1978).

Die auch durch Inosin stimulierte Freisetzung von Insulin ließ sich aufklären. Eine in Inseln vorhandene Nukleosid-Phosphorylase spaltet Inosin in Ribose-1-phosphat und Hypoxanthin. Der Ribose-Anteil des Inosins wird nun im

Pentosephosphatshunt (PPS) zum Glycerinaldehyd-3-phosphat abgebaut (CAPITO u. HEDESKOV, 1976).

Insulinsekretion und Glucoseutilisation der ß-Zelle zeigen die gleiche extrazelluläre Glucosekonzentrationsabhängigkeit. Beide Dosis-Wirkungs-Kurven zeigen sigmoiden Verlauf, haben eine Schwellenkonzentration von 5 mM, einen Km-Wert von etwa 8 mM und ein Plateau von annähernd 20 mM Glucose (ASHCROFT et al., 1972c und 1973). Eine Reihe weiterer Parameter, wie Glucoseoxidation, Gehalt an Glucose-6-phosphat (ASHCROFT et al., 1970), Lactatbildung (MATSCHINSKY u. ELLERMANN, 1973; PACE et al., 1975) und Sauerstoffverbrauch (HELLERSTRÖM u. GUNNARSSON, 1970) zeigen die gleiche Abhängigkeit von der extrazellulären Glucosekonzentration wie die Insulinsekretion selbst.

Die Aufnahme der D-Glucose in die ß-Zelle wird durch ein spezifisches Transportsystem (Carrier) vermittelt (HELLMAN et al., 1971a; MATSCHINSKY et al., 1975a). Die Kapazität dieses Carriers in der ß-Zellmembran gehört mit zu der höchsten, die in Zellmembranen überhaupt gefunden wurde (HELLMAN et al., 1971a).
L-Glucose kann nicht in die B-Zelle aufgenommen werden, verbleibt im Extrazellulärraum (HELLMAN et al., 1971a, 1971b) und führt nicht zur Insulinsekretion (ASHCROFT et al., 1972b).
Der Glucosemetabolismus in der Insel und die Sekretion von Insulin zeigen uneingeschränkte Spezifität für D-Glucose. Die größere Wirksamkeit von α-D-Glucose als Stimulator der Insulinsekretion im Vergleich mit ß-D-Glucose (NIKI et al., 1974; MATSCHINSKY et al., 1975) ist auf die Stereospezifität der Glucose-6-phosphat-Isomerase für α-D-Glucose-6-phosphat zurückzuführen (MALAISSE et al., 1976b).

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Glucosemetabolismus ist die Phosphorylierung der Glucose zu Glucose-6-phosphat durch das Glucokinase-Hexokinase-System der B-Zelle (ASHCROFT u. RANDLE, 1970; HEDESKOV u. CAPITO, 1974).
Wird dieser Reaktionsschritt durch Mannoheptulose, einem Inhibitor der Glucosephosphorylierung (ASHCROFT u. RANDLE, 1970) gehemmt, so kommt es nicht zur Glucose-induzierten Insulinsekretion (MALAISSE et al., 1968; ASHCROFT et al., 1973).
Da D-Glycerinaldehyd erst auf dem Triosephosphat-Niveau in die Glykolyse eintritt, ist Mannoheptulose nicht in der Lage, die nachfolgende Metabolisierung zu hemmen (ASHCROFT et al., 1973). Die Tatsache, daß es durch diesen Hemmstoff auch nicht zu einer Hemmung der D-Glycerinaldehyd-stimulierten Insulinsekretion kommt (ASHCROFT et al., 1973; HELLMAN et al., 1974a), ist ein weiterer für die 'Substrat-site'-Hypothese sehr beweiskräftiger Befund.

2-Desoxy-D-glucose, ein weiterer Inhibitor des Glucoseabbaus (hemmt Umwandlung von Glucose-6-phosphat zu Fructose-6-phosphat), verringert ebenfalls die glucoseinduzierte Insulinsekretion (ZAWALICH et al., 1979).

Im Gegensatz zu einer früheren Untersuchung (MATSCHINSKY u. ELLERMAN, 1973), besteht inzwischen weitgehendste Übereinstimmung, daß Iodacetat, ein Inhibitor der Triose-phosphat-Dehydrogenase-Reaktion, eine gleichzeitige Hemmung von Glucoseutilisation und Sekretion von Insulin auf Glucosereiz zur Folge hat (ASHCROFT u. RANDLE, 1975; ZAWALICH et al., 1977).

Die hier geschilderten Versuchsergebnisse demonstrieren eine enge Korrelation zwischen der Metabolisierbarkeit von verschiedenen Zuckern im Rahmen des Glykolysestoffwechsels und der damit verbundenen Fähigkeit zur Initierung der Insulinsekretion.

Nach Bildung des Glucose-6-phosphats sind in der Insel grundsätzlich zwei Stoffwechselwege möglich: Glykolyse und Pentosephosphatzyklus.
Der überwiegende Anteil der Glucose wird über die Glykolyse abgebaut, die Energie in Form von ATP bereitstellt. Über die Funktionen des ATP im Sekretionsprozeß können nur Vermutungen angestellt werden. ATP kann von Bedeutung sein als Substrat der Adenylatcyclase, der Na^+-K^+-Pumpe und verschiedener Ca^{2+}-ATPasen. Möglicherweise wird ATP auch für die Bewegung der Insulingranula zur Plasmamembran benötigt (MALAISSE et al., 1979; HOWELL u. TYHURST, 1982).
Die Bereitstellung eines Schlüsselmetaboliten auf oder unterhalb der Triosephosphat-Stufe, der den erhöhten Substratdurchsatz weiterleitet, wird als eine entscheidende Funktion des Glykolysestoffwechsels angesehen. Von den möglichen Metaboliten spielt Phosphoenolpyruvat (PEP) eine bedeutende Rolle bei der Auslösung der Insulinsekretion. Die bereits beschriebenen Funktionen von PEP machen deutlich, daß PEP zwar ein notwendiger Modulator des Sekretionsprozesses sein kann, daß aber allein eine gesteigerte Konzentration von Phosphoenolpyruvat noch keine ausreichende Bedingung für die Auslösung der Insulinsekretion darstellt.

Daß auch reduzierte Pyridinnukleotide eine Rolle im Sekretionsprozeß spielen, konnte durch Untersuchungen mit 6-Aminonicotinamid (6-AN), einem Antimetaboliten

der Pyridinnukleotidsynthese gezeigt werden (AMMON et al., 1973). Bei isolierten Inseln von Ratten führte 6-AN zu einer signifikanten Hemmung der Insulinsekretion; auf Vorbehandlung mit 6-AN reagierten die Versuchstiere mit einer Hyperglykämie (AMMON u. STEINKE, 1972).
Durch Steigern der Glucosekonzentration von 5 auf 20 mM zeigten PANTEN et al. (1973) einen Fluoreszenzanstieg der reduzierten Pyridinnukleotide. Auch Mannose und Leucin verursachten einen Fluoreszenzanstieg (PANTEN et al., 1973, 1974). AMMON et al. (1979a, 1980) konnten nachweisen, daß mit steigender Glucosekonzentration auch der NADPH/NADP-Quotient in der Insel ansteigt. Leucin (10 mM) konnte diesen Glucoseeffekt noch verstärken (AMMON et al., 1979a).
Mit Hilfe einer von VEECH et al. (1969) eingeführten Methode gelang es ASHCROFT u. CHRISTIE (1979) den Anstieg des cytosolischen NADPH/NADP-Quotienten (von 16 auf 26) auf die gesteigerte extrazelluläre Glucosekonzentration (von 2 auf 20 mM) zurückzuführen.
Die Verwendung von Substanzen, die eine Verschiebung des Redoxgleichgewichts zur oxidierten Seite hin verursachen, wie NH_4^+ (SENER et al., 1978), Menadion (MALAISSE et al., 1978a, 1978b) und Methylenblau (AMMON u. VERSPOHL, 1979) führten zu einer gleichzeitigen Hemmung der Glucose-induzierten Insulinsekretion.

Die zum NADPH/NADP-Gleichgewicht ermittelten Befunde ließen auf eine wichtige Bedeutung des Pentosephosphatshunts (PPS), einem Hauptlieferanten von NADPH, für die durch Glucose ausgelöste Insulinsekretion schließen. Die Erkenntnis, daß exogenes Insulin den NADPH/NADP-Quotienten senkt und die Glucose-induzierte Insulinsekretion hemmt, ist wahrscheinlich auf eine verringerte PPS-Akti-

vität zurückzuführen (AMMON u. VERSPOHL, 1976). Die Anwesenheit von GPAIS (Guinea pig antiinsulin serum), durch das die Akkumulation von sezerniertem Insulin im Inkubationsmedium verhindert wurde, ermöglichte die Zunahme der PPS-Aktivität (von 2,3% auf 9,4%) in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration (von 5.6 auf 16.7 mM) im Medium (VERSPOHL et al., 1979).
Daß sezerniertes Insulin über einen Feedback-Mechanismus seine eigene Freisetzung über den PPS hemmt, wäre eine mögliche Erklärung, daß in früheren Untersuchungen (SNYDER et al., 1970; ASHCROFT et al., 1972c) keine Steigerung der PPS-Aktivität nach Erhöhung der Glucosekonzentration gefunden wurde.
In diesem Zusammenhang sollte auch darauf hingewiesen werden, daß die Inselzelle neben den PPS-Enzymen Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Gluconsäure-6-phosphat-Dehydrogenase noch über weitere Enzyme (Malatenzym, Isocitrat-Dehydrogenase) verfügt, die an der Regulation des cytosolischen NADPH-Spiegels beteiligt sind (ASHCROFT u. CHRISTIE, 1979).
Neuere Befunde (HEDESKOV et al., 1983) bestätigen die Vermutung, daß der cytosolische NADH/NAD-Quotient keine bedeutende Rolle bei der Regulation der Insulinsekretion spielt.

1.1.3 Thiole und Insulinsekretion

Dem Ansteigen der Produktionsrate reduzierter Pyridinnukleotide, insbesondere einer Erhöhung der Konzentration des Coenzyms NADPH, wird allgemein eine Vermittlerrolle zwischen den beschriebenen metabolischen Ereignissen im Innern der B-Zelle und den Änderungen von Eigenschaften der B-Zellmembran zuerkannt.
HENQUIN (1978a) gelang es, eine Verbindung zwischen NADPH/NADP-Quotienten und K^+-Permeabilität in der Weise herzustellen, daß eine Verminderung des Gehaltes an reduzierten Pyridinnukleotiden durch Methylenblau oder Phenazinmethosulfat zu einem Anstieg des K^+-Effluxes führte, während eine Erhöhung des NADPH-Levels durch Pentobarbital den K^+-Efflux verminderte. Es stellt sich jedoch die Frage, ob NADPH als Coenzym Wasserstoff übertragender Enzyme (Dehydrogenasen, Oxidoreduktasen) in der Lage ist, direkt Ionenfluxe in der B-Zellmembran zu regulieren.
AMMON und STEINKE vermuteten schon 1972, daß eine wichtige Rolle von NADPH im Sekretionsprozeß wohl darin bestünde, Glutathion im reduzierten Zustand zu halten. Diese Hypothese wurde ergänzt durch die Möglichkeit, daß das GSH/GSSG-Redoxsystem mit einem membran-gebundenen Thiol/Disulfid-System verbunden ist und so Einfluß auf Membranereignisse nehmen könnte (HELLMAN et al., 1974b).
Aus Untersuchungen an Erythrocyten ist bekannt, daß oxidiertes Glutathion (GSSG) durch eine NADPH-abhängige Glutathionreductase wieder in die SH-Form überführt wird. Aktivitäten dieses Enzyms konnten in Inseln von Meerschweinchen (AGREN et al., 1978) und von Ratten (ANJANEYULU et al., 1982; LEBSANFT, 1983) nachgewiesen werden. Auch in Inselzellen ist NADPH (nicht NADH) das bevorzugte Coenzym für die Glutathionreductase (ANJANEYULU, 1982).

Die folgenden Befunde verdeutlichen die Abhängigkeit der Insulinsekretion vom Redoxgrad des Glutathionsystems:

- Glucosekonzentrationen, die zur Steigerung des NADPH/NADP-Quotienten und zur Insulinsekretion führen, erhöhen den GSH/GSSG-Quotienten (AMMON et al., 1980; ANJANEYULU et al., 1982).

- Leucin (10 mM) erhöht in Gegenwart einer substimulatorischen Glucosekonzentration (5.6 mM) den GSH-Gehalt und stimuliert die Insulinsekretion (AMMON et al., 1981).

- Exogenes Insulin, das über einen Feed-back-Mechanismus seine eigene Freisetzung nach Stimulation durch Glucose bzw. Glucose und Tolbutamid hemmt, senkt den GSH-Gehalt in der Insel (AMMON et al., 1980). Dieser Befund korreliert mit der gleichzeitigen Hemmung der PPS-Aktivität und einem Abfall des NADPH/NADP-Quotienten (AMMON u. VERSPOHL, 1976; AKHTAR et al., 1977).

- Methylenblau, das wie bereits erwähnt, zur Verringerung des NADPH/NADP-Quotienten und zur Hemmung der Insulinsekretion führt, vermindert auch den GSH/GSSG-Quotienten (AMMON u. VERSPOHL, 1979; AMMON et al., 1979b).

- Diamid, ein membrangängiges Thiol-Oxidans (KOSOWER et al., 1969, 1972) und tertiäres Butylhydroperoxid (t-BHP), das als Substrat der Glutathionperoxidase zur Senkung des GSH-Gehaltes führt (SIES et al., 1972; SRIVASTAVA et al., 1974) hemmen die Glucose-induzierte Insulinsekretion (AMMON et al., 1977 und 1979a).

- Die durch Leucin (10 mM) bzw. Tolbutamid (0.1 mg/ml) potenzierte Insulinsekretion wird durch Methylenblau, Diamid und t-BHP ebenfalls gehemmt (AMMON et al., 1979a, 1979b).

Aus den geschilderten Ergebnissen können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

- o Der Redox-Status des GSH/GSSG-Systems in der Insel wird durch Glucose erhöht und durch exogenes Insulin verringert. Diese Effekte sind auf steigernde/hemmende Einflüsse von Glucose/exogenes Insulin auf PPS und NADPH/NADP-Quotient zurückzuführen.

- o Leucin und Tolbutamid führen zu keiner Erhöhung des GSH-Gehalts in Abwesenheit von Glucose. Ihre synergistische Wirkung zusammen mit Glucose ist jedoch von einem hohen intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten abhängig, welcher über PPS und NADPH durch den Glucosemetabolismus bereitgestellt wird.

Um Aufschluß über eine mögliche Rolle eines membranständigen Thiol/Disulfid-Systems zu erhalten, wurden verschiedene Thiolreagenzien eingesetzt, die nicht oder nur sehr langsam in die B-Zelle eindringen und die die Zellmembran durch Reaktion mit oberflächlichen SH-Gruppen beeinflussen können.

Iodacetat und Iodacetamid, zwei alkylierende Substanzen, die die B-Zellmembran nur langsam permeieren, potenzieren die Glucose-induzierte Insulinsekretion, allerdings nur so lange ihre intrazellulären Konzentrationen noch nicht ausreichen, um die Glykolyse zu hemmen (HELLMAN et al., 1973a, PAGLIARA et al., 1975). Ethacrynsäure, die ebenfalls zur Alkylierung oberflächlicher Sulfhydrylgruppen führt, verursacht eine kurzfristige monophasische Insulinsekretion am perfundierten Rattenpankreas. Die anschließende Hemmung der Sekretion ist auf eine Reaktion mit SH-Gruppen von Enzymen der Glykolyse und der oxidativen Phosphorylierung zurückzuführen (LANDGRAF-LEURS et al., 1978).

Organische Disulfide, wie 5.5'Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) und 6.6'-Dithiodinicotinsäure (CPDS), die Disulfidbrücken zwischen Membran und Reagenz und zwischen zwei benachbarten SH-Gruppen in der Membran bilden können (ELLMAN, 1959; GRASSETTI, 1969), stimulieren die Insulinsekretion (HELLMAN et al., 1973b).

Die organischen Quecksilberverbindungen, p-Chloromercuribenzoat (p-CMB) und p-Chloromercuribenzolsulfonsäure (p-CMBS), die reversible Mercaptide bilden, verursachen ebenfalls eine stimulierende Wirkung auf die Insulinsekretion (BLOOM et al., 1972; AMMON et al., 1977).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, daß Protein-Sulfhydrylgruppen an der Oberfläche der ß-Zellmembran an der Regulierung der Insulinsekretion beteiligt sind. Aus mehreren Untersuchungen (RINK, 1974; ISAACS u. BINKLEY, 1977; KOSOWER et al., 1982) sind enge Beziehungen zwischen intrazelluärem GSH und Membranthiolgruppen bekannt. Eine mögliche Verbindung zwischen intrazellulärem NADPH, GSH und Membranthiolen konnte inzwischen auch für die B-Zelle hergestellt werden.
Die durch p-CMB stimulierte Insulinsekretion zeigte sowohl eine Abhängigkeit vom intrazellulären NADPH/NADP- als auch vom GSH/GSSG-Quotienten, wie aus der Hemmung dieser Sekretion durch Methylenblau, Diamid, t-BHP (AMMON et al., 1977) und durch exogenes Insulin (AMMON et al., 1980) gefolgert werden kann.
Der von ANJANEYULU et al. (1982) bestätigte Anstieg des GSH/GSSG-Quotienten (AMMON et al., 1980) auf Glucosereiz (16.7 mM) und der damit verbundenen Zunahme der Sulfhydrylgruppen (von 119 auf 170 pmol/µg Protein) läßt auf eine Glucose-induzierte Reduktion von Disulfidbrücken in Membranen der Inseln schließen.

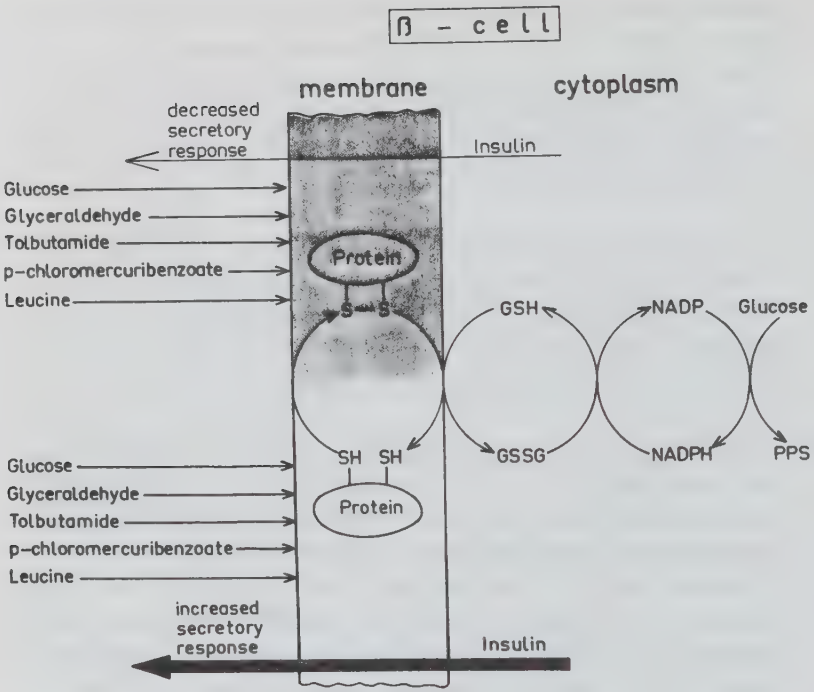


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Zusammenhänge zwischen Glucosemetabolismus (PPS), NADPH/NADP, GSH/GSSG und dem Redoxstatus des Membranthiol/-disulfid-Systems (AMMON et al., 1980).

Die Abgabe von Insulin als Reaktion auf eine Stimulierung ist abhängig vom Redoxstatus des Proteinthiol/-disulfid-Systems in der B-Zellmembran. Eine Erhöhung des Reduktionszustandes und damit verbunden eine gesteigerte Sekretionsantwort wird möglicherweise über folgende Reaktionswege erreicht: Glucosemetabolismus (PPS) → NADPH → GSH → Reduktion von Proteindisulfiden.

Die von AMMON et al., 1980 in einem Schema (Abb. 1.3) postulierte Bedeutung des Redoxstatus von Membranthiolen im Mechanismus der Insulinsekretion konnte durch die beschriebenen Befunde aus nachfolgenden Untersuchungen noch bestätigt werden. Es ist deshalb davon auszugehen, daß der Redoxstatus des GSH/GSSG-Systems, der über den PPS und NADPH und damit über den Glucosemetabolismus beeinflußbar ist, über die Verbindung zu einem membrangebundenen Thiol/Disulfid-System einen modulierenden Einfluß auf die Freisetzung von Insulin ausübt.

Eine mögliche reduktive Spaltung von Membran-Disulfidbrücken zu Membranprotein-Sulfhydrylgruppen durch eine gesteigerte Produktion von NADPH und GSH könnte die Ursache der durch Glucose-induzierten Änderung der Ionenpermeabilität der B-Zellplasmamembran sein. Die Parallelität von gesteigerter Insulinsekretion und Calciumaufnahme nach Stimulation mit p-CMB und p-CMBS (HELLMAN et al., 1975a; ERLICHMAN et al., 1979) bestätigen diese Vermutung.

Durch Verwendung von Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazid)(DIP), einem membrangängigen Thioloxidans und dessen nicht membrangängigen Dijodsalz (DIP^{2+}) (KOSOWER et al., 1974, 1976) war man in der Lage

- mit DIP^{2+} spezifisch extrazelluläre Thiole zu oxidieren, was mit einer Stimulierung der Ca^{2+}-Aufnahme und der Insulinsekretion bei substimulatorischer Glucosekonzentration einherging (AMMON et al., 1983).

- mit DIP zusätzlich intrazelluläre Thiole zu oxidieren, was zur Hemmung beider Parameter bei stimulatorischer Glucosekonzentration (20 mM) führte (AMMON et al., 1983). Die Ca^{2+}-Aufnahme und die nachfolgende Insulinsekretion stimuliert durch Ionophor A-23187 kann durch

DIP nicht mehr beeinflußt werden (AMMON et al., 1983), ein erster Hinweis, daß die Schritte im Sekretionsmechanismus, die der Ca^{2+}-Aufnahme folgen, durch das GSH/GSSG-System nicht beeinflußbar sind.

Eine entscheidende Beeinflussung des Glucose-induzierten Rubidiumeffluxes konnte dagegen weder mit DIP noch mit DIP^{2+} gezeigt werden (WAHL, 1984), ein Befund, der darauf hindeutet, daß die K^+-Permeabilität der Zellmembran nicht der Regulation durch Thiole unterliegt.

Die Erkenntnis, daß auch exogen zugeführte Thiole möglicherweise durch Spaltung von Membrandisulfiden zu einer Beeinflussung der Insulinsekretion führen, basiert auf einer Arbeit von HELLMAN et al. (1975b), in der eine Potenzierung der durch Glucose (10 mM) ausgelösten Insulinsekretion durch GSH, 1-Thio-D-Glucose und an Dextran gebundenem L-Cystein demonstriert werden konnte. Der potenzierende Effekt trat jedoch nur bei einer Konzentration von 0.1 mmol/l auf.
Am perfundierten Pankreas der Ratte konnte GSH (1.0 mM) und L-Cystein (5.0 mM) die durch Glucose (11.1 mM), Tolbutamid (0.2 mg/ml) und Glucose zusammen mit Tolbutamid (0.1 mg/ml) induzierte Insulinsekretion ebenfalls steigern (AMMON u. ABDEL-HAMID, 1981).
Exogene Thiole wurden auch hinsichtlich ihrer Wirkung auf Ionenfluxe untersucht.
STRÖLIN (1983) konnte die durch Glucose-induzierte Calciumaufnahme durch exogenes GSH noch weiter erhöhen. Auf den ^{85}Rb-Efflux konnte jedoch durch GSH (0.1 mM) keinen Einfluß ausgeübt werden (WAHL, 1984). Die von HENQUIN (1980) publizierte Hemmung des ^{85}Rb-Effluxes durch GSH in 100-fach höherer Dosierung in Abwesenheit von Glucose ist nicht sehr aussagekräftig.

Zur Beantwortung der Frage, ob die Abhängigkeit vom Redoxstatus intrazellulärer Thiole ein generelles Merkmal von Stimulatoren der Insulinsekretion darstellt oder ob dies nur an bestimmte Sekretionsauslöser gekoppelt ist, wurden Stimulatoren, von denen unterschiedliche Mechanismen hinsichtlich ihrer insulinfreisetzenden Wirkung bekannt sind, dahingehend untersucht, inwieweit ihre Wirkung durch ein Thiol (GSH) gesteigert bzw. durch ein Thioloxidans (Diamid) gehemmt werden kann (AMMON et al., 1984). Die Arbeit führte zu folgendem Ergebnis:

- Die Insulin-freisetzende Wirkung von Glucose, Glycerinaldehyd, Tolbutamid und Leucin, die jeweils mit einer Steigerung der Ca^{2+}-Aufnahme korreliert, ist durch GSH potenzierbar und durch Diamid hemmbar, womit eindeutig Thiolabhängigkeit gezeigt werden konnte.

- Stimulatoren, die ihre Wirkung über die Beeinflussung des cAMP-Systems vermitteln (Isoprenalin, di-Butyryl-cAMP) oder die Ca^{2+} ionophorartig ins Zellinnere transportieren (Glibenclamid, Ionophor A-23187) zeigten keine Thiolabhängigkeit.

Aus den hier beschriebenen Beobachtungen können für den Sekretionsmechanismus folgende Erkenntnisse formuliert werden:

- Ein hoher Redoxstatus des intrazellulären GSH/GSSG-Systems, durch den Membranthiole in reduziertem Zustand gehalten werden, ist eine Voraussetzung für die durch Glucose induzierte Ca^{2+}-Aufnahme und Insulinsekretion.

- Für Ereignisse im 'Stimulus-secretion coupling', die im zeitlichen Ablauf erst nach der Ca^{2+}-Aufnahme lokalisiert werden, besteht keine Abhängigkeit vom Redoxzustand des intrazellulären GSH/GSSG-Systems.

1.1.4 Status und Funktionen von Glutathion und Cystein

A. Glutathion

Glutathion (γ-Glutamyl-cystein-glycin, GSH), das physiologisch bedeutsamste Nichtprotein-Thiol kommt in Zellen von Säugetieren, Pflanzen und Mikroorganismen vor. Die Besonderheiten der Struktur - γ-Peptid-Bindung und Thiolgruppe - bedingen die Funktionen dieses Tripeptids.
Der Glutathion-Status der Zelle wird definiert durch den Gesamtgehalt von Glutathion und durch das Verteilungsmuster der möglichen Formen, in denen Glutathion in der Zelle vorkommen kann. Die wichtigsten Formen außer GSH selbst sind sein Dimeres (GSSG) und gemischte Disulfide, hauptsächlich mit Proteinen (GSS-Protein). Weitere Verbindungen sind Thiolester und GSH-Derivate, die nicht durch Reaktion mit der SH-Gruppe gebildet werden. Andere zelluläre Komponenten, die chemisch ähnlich wie GSH oder GSSG reagieren, z.B. Cystein oder reaktive Disulfide müssen für die Beschreibung des GSH-Status ebenfalls berücksichtigt werden (KOSOWER u. KOSOWER, 1978).
Unter dem Begriff "Status" darf kein konstanter Wert für GSH-Gehalt und Verteilungsmuster der möglichen Formen angenommen, sondern muß die Beschreibung eines dynamischen Systems verstanden werden, dessen Gleichgewicht Änderungen unterliegt. Änderungen im Verteilungsmuster, wie Anstieg des GSSG und Abfall von GSH können eine Vielzahl physiologischer und pathologischer Konsequenzen nach sich ziehen (KOSOWER u. KOSOWER, 1978). Welche Auswirkung eine Änderung für die isolierte Insel in Bezug auf die Insulinsekretion hat, wurde bereits beschrieben. Normalerweise ist freies GSH in Konzentrationen von 0.5 - 10.0 mM die Hauptform von Glutathion im Zellinnern, während im Extrazellulärraum nur mikro-

molare Konzentrationen nachweisbar sind.
Von der oxidierten Form (GSSG) werden in der Regel intrazelluläre Konzentrationen zwischen 5 und 50 µM mit Spitzenwerten um 500 µM gemessen.
Über den Gehalt der Zelle an gemischten Disulfiden wie GSS-Protein oder GSSR (R = Cystein, Homocystein, Coenzym A u.a.) werden von Zelle zu Zelle sehr unterschiedliche Angaben (1 - 50% des Gesamtglutathions der Zelle) gemacht (KOSOWER u. KOSOWER, 1978).

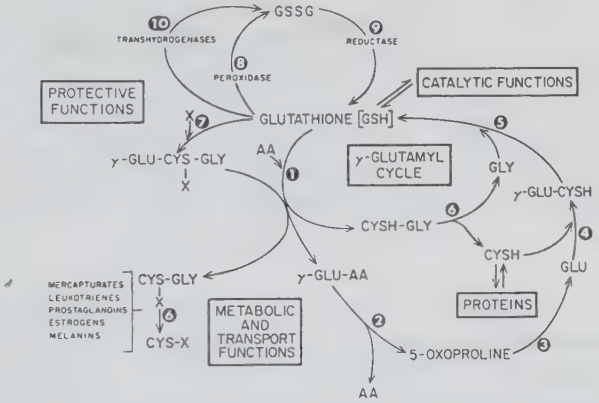


Abb. 1.4: Überblick über den Metabolismus und die Funktionen von Glutathion (MEISTER, 1983).
Enzyme: (1) γ-Glutamyl-Transpeptidase; (2) γ-Glutamyl-Cyclotransferase; (3)5-Oxoprolinase; (4) γ-Glutamyl-cystein-Synthetase; (5)Glutathion-Synthetase; (6)Dipeptidase; (7)Glutathion-S-Transferase; (8) Glutathion-Peroxidase; (9)Glutathion-Reduktase; (10)Transhydrogenasen.
AA = Aminosäuren; X = Verbindungen, die mit GSH Konjugate bilden.

Die bedeutendsten Funktionen von Glutathion und deren Zusammenhänge wurden von MEISTER (1983) in einem Übersichtsschema (Abb. 1.4) zusammengefaßt. Die Schutzfunktion von GSH gegenüber oxidierenden Noxen wird hauptsächlich über die Enzymaktivitäten der Glutathion-Peroxidase(8)

und verschiedener Transhydrogenasen(10) vermittelt. Die Glutathion-Reduktase(9) reduziert gebildetes GSSG in Verbindung mit NADPH-liefernden Reaktionen und stellt so GSH erneut zur Verfügung.
Organische Peroxide und H_2O_2 werden mit Hilfe der Glutathion-Peroxidase unter Verbrauch von GSH beseitigt (MEISTER, 1975), wodurch Proteine und Lipide in Zellmembranen gegen freie Radikale und Peroxidbildung geschützt werden können.

Eine wichtige Rolle spielt Glutathion auch bei der Spaltung von Disulfidbrücken niedermolekularer Verbindungen (z.B. Cystin, gemischte Disulfide und Coenzym A) und von Proteinen und Polypeptiden (MANNERVIK u. AXELSSON, 1978). Katalysiert werden diese Reaktionen, je nach Gewebe und Substrat, durch verschiedene Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen (FLOHE u. GÜNZLER, 1976; MANNERVIK u. AXELSSON, 1980; KOSOWER u. KOSOWER, 1983).

Synthese und Abbau von GSH verlaufen über die Reaktionsschritte des γ-Glutamyl-Zyklus (MEISTER u. TATE, 1976; MEISTER, 1981).
Die Bildung von Glutathion aus L-Glutamat, L-Cystein und Glycin wird katalysiert durch die beiden ATP-abhängigen Enzyme γ-Glutamylcystein(4)- und Glutathion-Synthetase(5). Der GSH-Spiegel wird reguliert durch eine nicht allosterische Feed-back-Hemmung von GSH auf die γ-Glutamylcystein-Synthetase(4) (RICHMAN u. MEISTER, 1975).
Durch die sehr ungewöhnliche γ-Peptidbindung besitzt das Glutathionmolekül eine Resistenz gegenüber Proteasen und Aminopeptidasen, und einen Schutz vor zu schneller Oxidation der Sulfhydrylgruppe. Mit dem ersten Abbauschritt ist gleichzeitig die Aufnahme von bestimmten Aminosäuren in die Zelle verbunden, nach MEISTER (1983) eine Hauptfunktion des Zyklus.

Die γ-Glutamyl-Transpeptidase(1) überträgt den γ-Glutamyl-Anteil des intrazellularen GSH auf bevorzugte Aminosäuren, die durch diesen Mechanismus durch die Zellmembran geschleust werden. Durch Einwirkung der γ-Glutamyl-Cyclotransferase(2) entstehen die freien Aminosäuren und 5-Oxo-L-prolin, das durch die 5-Oxo-L-Prolinase(3) in L-Glutamat gespalten wird. Eine Dipeptidase(6) spaltet Cysteinylglycin, wodurch alle Aminosäuren erneut für die Synthese von GSH zur Verfügung stehen.

Der Vollständigkeit halber soll hier auch die Bildung von S-substituierten Derivaten des GSH mit einer Vielzahl körpereigener sowie fremder Substanzen erwähnt werden. Diese GSH-Konjugate werden in spontaner Reaktion oder katalysiert durch GSH-S-Transferasen(7) gebildet. Die Ausscheidung der Konjugate bzw. ihrer Abbauprodukte (Mercaptursäuren) dient der Entgiftung der Zelle (MEISTER, 1981).

B. Cystein

Für Zellen verschiedener Gewebe stellt intrazelluläres Glutathion ein physiologisches Reservoir für Cystein dar (TATEISHI et al., 1977; REED et al., 1983), das im Vergleich zu GSH (0.5 - 10.0 mM) nur in Konzentrationen von 10 - 300 µM zu finden ist (TATEISHI et al., 1974; FINKELSTEIN et al., 1982). Der intrazelluläre Gehalt der oxidierten Form (Cystin) ist jedoch noch geringer, so daß die reduzierte Form bei weitem überwiegt, während im Extrazellulärraum umgekehrte Verhältnisse vorherrschen (CRAWELL u. SEGAL, 1967).
In Untersuchungen zur Klärung des Einflusses von Cystein auf den Glutathionstatus bei isolierten Hepatocyten von Ratten konnte eine Kompartimentierung von GSH festgestellt werden (HIGASHI et al., 1977), die auch für andere

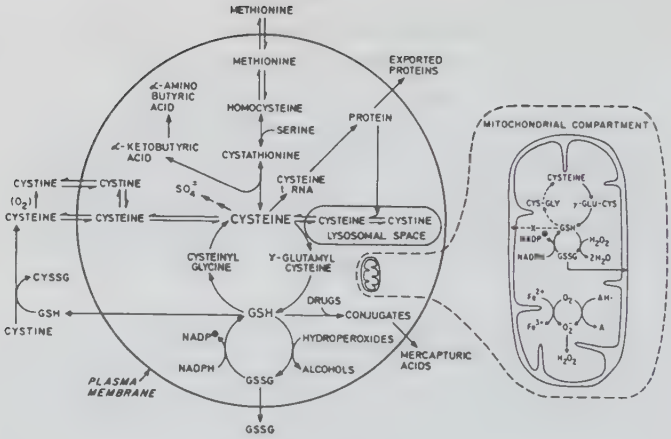


Abb. 1.5: Schematische Übersicht über die Rolle von Cystein in Hepatocyten der Ratte (REED et al., 1983)

Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen wahrscheinlich ist. Der 'labile' GSH-Pool (Halbwertszeit: 1.7 h) hat eine regulierende Funktion. Er dient entweder als Reservoir für überschüssiges Cystein oder setzt Cystein für die Proteinsynthese frei, wenn andere Quellen erschöpft sind. Als SH-Lieferant für viele notwendige Reaktionen in der Zelle dient der 'stable' Pool (Halbwertszeit: 28.5 h), der auch über eine längere Hungerperiode aufrechterhalten wird, während der 'labile' Pool durch Freisetzen von Cystein für die Proteinsynthese sehr schnell abgebaut werden kann (TATEISHI u. HIGASHI, 1978). Die Lokalisierung dieser verschiedenen GSH-Kompartimente innerhalb der Zelle gelang MEREDITH und REED (1982). Sie konnten in Hepatocyten ein stabiles GSH-Reservoir in den Mitochondrien vom weniger stabilen cytoplasmatischen GSH-Pool unterscheiden (Abb. 1.5).

Von den drei Aminosäuren, die Glutathion bilden, ist wahrscheinlich Cystein, bedingt durch den niedrigen intrazellulären Gehalt, die Aminosäure, die die Syntheserate limitiert. Der hohe K_m-Wert (2.5 mM) des synthetisierenden Enzymsystems für Cystein ist ein Beleg für diese Vermutung (TATEISHI et al., 1974). Von Erythrocyten ist bekannt, daß die Cysteinaufnahme den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glutathionsynthese darstellt (HEINLE et al., 1976). Ein erhöhtes Angebot von Cystein mit der Nahrung führt konsequenterweise zur Steigerung der Glutathionsynthese (TATEISHI et al., 1977). Ein Cysteinmangel in der Nahrung kann der Säugetierorganismus durch Biosynthese der Aminosäure ausgleichen, vorausgesetzt, daß L-Methionin in ausreichender Menge zur Verfügung steht. Der Syntheseweg vom Methionin über das Cystathionin (Abb. 1.5) ist wahrscheinlich die einzige Möglichkeit für die Bildung von Cystein in Zellen von Wirbeltieren (GREENBERG, 1975). Insbesondere Hepatocyten zeigen eine intensive Nutzung des Cystathionin-Weges für den Einbau von Methionin-Schwefel in Cystein (BEATTY u. REED, 1980, 1981). Zellen anderer Organe haben nur begrenzte oder überhaupt keine Möglichkeit, Cystein zu synthetisieren und sind deshalb auf extrazelluläre Cystein- und Cystin-Quellen zur Aufrechterhaltung intrazellulärer GSH-Pools angewiesen (REED et al., 1983).
L-Cystein wird sehr schnell in die Zelle aufgenommen, während vom Disulfid nur eine geringe Aufnahmerate gemessen werden konnte (REED u. BEATTY, 1978). Über den GSH-Efflux besteht allerdings die Möglichkeit einer extrazellulären Umwandlung von Cystin in Cystein (Abb. 1.5). In dieser durch eine Thioltransferase (ERIKSSON et al., 1974) katalysierten Thiol-Disulfid-Austauschreaktion liegt das Gleichgewicht weitgehend auf der Seite des Cysteins.

1.2 Fragestellung

Der Redoxstatus eines membran-gebundenen Proteinthiol/-disulfid-Systems der B-Zelle ist möglicherweise in Verbindung mit dem intrazellulären GSH/GSSG-System an der Regulation der durch Glucose stimulierten Sekretion von Insulin beteiligt (AMMON et al., 1980). Eine Beeinflussung dieses Zellmembranthiolstatus über den intrazellulären GSH-Gehalt ist wie in anderen Zellen bereits nachgewiesen (KOSOWER u. KOSOWER, 1983) auch für die B-Zelle denkbar. Daß auch eine direkte Einflußnahme auf die B-Zellmembran durch exogen zugeführte Thiole möglich ist, lassen die beschriebenen Daten (s. 1.1.3) von HELLMAN et al. (1975b) vermuten.

1. In der vorliegenden Arbeit sollte nun der Einfluß thiolhaltiger Substanzen auf die Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte sowohl bei stimulatorischer als auch bei substimulatorischer Glucosekonzentration untersucht werden.
Die Auswahl der Thiole richtete sich nach ihren Fähigkeiten, Disulfidbrücken größerer Moleküle zu spalten bzw. zur Erhöhung des intrazellulären GSH-Gehaltes beizutragen. Dazu ist eine relativ gute Stabilität der SH-Gruppe und eine geringe Neigung zur Autoxidation erforderlich. Es wurden deshalb folgende Substanzen ausgewählt:

1. Reduziertes Glutathion (GSH)
2. N-Acetyl-L-cystein
3. L-Cystein-methylester
4. L-Cystein-ethylester
5. Natrium-2-mercaptoethansulfonat (Mesna)
6. 2-Mercaptopropionylglycin (Tiopronin)

Mit Ausnahme von reduziertem Glutathion besitzen alle eine therapeutische Bedeutung als Mukolytika, indem sie zur Zerstörung von Disulfidbrücken der Glucoproteine des Schleims führen.
Reduziertes Glutathion (1.), das ubiquitär vorkommende physiologische Reduktionsmittel sollte als Modell- und Vergleichssubstanz dienen, zumal bereits positive Befunde von einzelnen GSH-Konzentrationen bekannt sind (HELLMAN et al., 1975b; AMMON u. ABDEL-HAMID, 1981).
Die Cystein-Derivate (2., 3. u. 4.) mit gleichfalls vorhandener freier SH-Gruppe neigen weniger zur Autoxidation als L-Cystein selber.
Mesna (5.) und Tiopronin (6.), Substanzen mit gleichfalls freier SH-Gruppe verfügen nicht über die Aminosäurestruktur von L-Cystein in ihrem Molekülaufbau.

Von jeder dieser Substanzen muß zur Beantwortung der Fragestellung eine Dosis-Wirkungs-Kurve in Bezug auf die Sekretion von Insulin bei stimulatorischer und substimulatorischer Glucosekonzentration erstellt werden.

Positive Ergebnisse von Thiolen im Sinne einer Steigerung der Glucose-induzierten Insulinsekretion und Daten von Mercaptanen, die keine Beeinflussung der Sekretion zeigen, sollen Hinweis auf vorhandene Struktur-Wirkungs-Beziehungen ermöglichen. Ob dabei die freie SH-Gruppe erst in Verbindung mit der Struktur der natürlich vorkommenden Aminosäure L-Cystein eine entscheidende Rolle spielt, sollte ebenfalls geklärt werden.
Ein Vergleich der Thiole mit steigernder Wirkung hinsichtlich ihrer Maximaleffekte und der zur Erreichung erforderlichen Dosis sollte die Erstellung einer Reihenfolge entsprechend der Wirkungsstärke ermöglichen.

2. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung mußte die am Lehrstuhl angewandte Inkubationsmethode (ABDEL-HAMID, 1983) so optimiert werden, daß durch direkte Messung der Insulinkonzentrationen (bisher 2 Messungen zu verschiedenen Zeiten und Differenzbildung) die Anzahl der Proben verringert und dadurch kostengünstiger gearbeitet werden konnte.

3. Von den zu untersuchenden Thiolen ist, zumindest in hoher Konzentration, ein Angriff auf Disulfidbrücken des Insulins zu erwarten, was mit dem gleichzeitigen Verlust der Immunoreaktivität einhergeht. Deshalb muß in vorausgehenden Untersuchungen von jedem Thiol eine Höchstkonzentration festgelegt werden, bei der eine geringe Beeinflussung des Radioimmunoassays über die Auswertung der Versuche noch korrigiert werden kann.

4. Untersuchungen zur Stabilität der SH-Gruppe bei verschiedener Konzentration des jeweiligen Thiols unter Inkubationsbedingungen sollten Korrelationen zwischen Stabilität und Wirkung der Thiolkonzentration auf die Insulinsekretion ermöglichen.

Durch diese Untersuchung sollten Stoffe gefunden werden, die in der Lage sind den Gehalt der B-Zelle an reduziertem Glutathion zu erhöhen bzw. den Redoxzustand eines membranständigen Thiol/Disulfid-System auf die reduzierte Seite zu verschieben, um dadurch die Ansprechbarkeit der B-Zelle gegenüber Glucose zu verbessern.

2. MATERIAL

2.1 Versuchstiere

Für die Pankreatektomien wurden Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht von 200 - 300 g verwendet. Das Alter der Tiere lag zwischen drei und fünf Monaten. Die Tiere erhielten Standardtrockenfutter der Firma Altromin, Lage/Lippe und Trinkwasser ad libitum. Die Haltung erfolgte in Makrolon-Käfigen bei einer Raumtemperatur zwischen 24 und 26°C und 55 - 65% relativer Luftfeuchtigkeit.

2.2 Geräte

Digital (pH-Meter) Modell 3560	Beckmann Instruments GmbH, München
F-Diluter	Eppendorf Gerätebau
Gamma-Zähler 310	Beckmann Instruments GmbH, München
Schüttelwasserbad	Bachofer, Reutlingen
Spectralphotometer PM 6	Zeiss
Stereomikroskop SM 6	Nikon, Japan
Tischcomputer P 602	Olivetti GmbH
Ultraschallbad Econo-Clean	Spirig, CH-Rappersvil
Nylonnetze, Fadendicke 50 µm Maschenweite 54 µm	Maierthaler, Köln
Polystyrolröhrchen	Greiner, Nürtingen
Reagenz- und Zentrifugenröhrchen	Sarstedt Nümbrecht-Rommeldorf
Plexiglashalterungen für Netzträger	Eigenbau
Plexiglashauben zur Begasung der Proben	Eigenbau

2.3 Chemikalien

Collagenase (132 - 175 E/mg)	Worthington Biochem. Corp., Freehold, N.J., USA
Glutathion, reduziert	Boehringer, Mannheim
N-Acetyl-L-cystein	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
L-Cystein-methylester-HCl	Fluka AG, Buchs/Schweiz
L-Cystein-ethylester-HCl	Fluka AG, Buchs/Schweiz
2-Mercaptopropionylglycin (Tiopronin)	Fluka AG, Buchs/Schweiz
Natrium-2-mercaptoethan-sulfonat (Mesna)	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA
5.5'-Dithio-bis(-2-nitro-benzoesäure) (Ellmans Reagens)	Boehringer, Mannheim
α-D-Glucose	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Rinderserumalbumin	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA
Carbogen (95% O_2; 5% CO_2)	Mast, Tübingen
Aldehyd-Fuchsin n. Gomori	KEPEC, Siegburg
Insulin Radioimmunoassay Kit (INSIK-1)	Isotopendienst West, Dreieich
Ratteninsulin	Novo Lab., Kopenhagen

Alle anderen, nicht genannten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt in der jeweils reinsten Form (p.a.) bezogen.

2.4 Elektrolytlösungen

2.4.1 Hanks'Lösung (HANKS u. WALLACE, 1949)

Stammlösung:

NaCl	80.00 g
KCL	4.00 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0.60 g
KH_2PO_4	0.60 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.00 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.85 g
Aqua bidest. ad.	1000.0 ml

Diese Stammlösung wurde vor Gebrauch mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt und mit Glucose (0.5 mg/ml ≙ 2.8 mM) versetzt, um die Energieversorgung der Inseln während des Isolierungsprozesses sicherzustellen. Das pH wurde mit $NaHCO_3$-Lösung auf 7.35 eingestellt und während des Versuchs laufend überprüft.

2.4.2 Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung (KRB-Lösung)

Die verwendete KRB-Lösung setzt sich nach der Originalbeschreibung von UMBREIT et al. (1972) wie folgt zusammen:

NaCl-Lösung	0.90% = 154 mM	100 Teile
KCL-Lösung	1.15% = 154 mM	4 Teile
$CaCl_2$-Lösung	1.22% = 110 mM	3 Teile
KH_2PO_4-Lösung	2.11% = 154 mM	1 Teil
$MgSO_4$-Lösung	3.82% = 154 mM	1 Teil
$NaHCO_3$-Lösung	1.30% = 154 mM	21 Teile

Um die Lösungen längere Zeit aufbewahren zu können, wurden drei getrennte Lösungen folgender Zusammensetzung hergestellt:

Lösung A:

$NaCl$		69.20 g
KCl		3.61 g
KH_2PO_4		1.62 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$		2.93 g
Aqua bidest.	ad	1000.0 ml

Lösung B:

$NaHCO_3$		21.10 g
Aqua bidest.	ad	1000.0 ml

Lösung C:

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$		3.73 g
Aqua bidest.	ad	1000.0 ml

Die Lösungen wurden bei 4°C aufbewahrt und vor Verwendung in folgendem Verhältnis gemischt und mit Aqua bidest. verdünnt:

Lösung A:	1 Teil
Lösung B:	1 Teil
Lösung C:	1 Teil
Aqua bidest.:	7 Teile

Diese Mischung wurde 30 Min. mit Carbogen (95% O_2 + 5% CO_2) begast. Nach Zusatz von 2% Rinder-Serumalbumin und Einstellung des pH-Wertes auf 7.35 stand die KRB-Lösung für die Inkubation zur Verfügung; es mußte nur noch die jeweils im Inkubationsmedium gewünschte Menge Substanz darin gelöst werden.

2.5 Inkubationsmedien

Für die Versuche wurden folgende Lösungen verwendet:

2.5.1 Vorinkubationsmedium

KRB-Lösung — Rinderserumalbumin 2%
Glucose 2.8 mM

2.5.2 Hauptinkubationsmedium

Für die Versuche mit stimulatorischer Glucosekonzentration:

KRB-Lösung — Rinderserumalbumin 2%
Glucose 11.1 mM

Für die Versuche mit substimulatorischer Glucosekonzentration:

KRB-Lösung — Rinderserumalbumin 2%
Glucose 2.8 mM

Die zu testenden Substanzen wurden unmittelbar vor Gebrauch im jeweiligen Hauptinkubationsmedium gelöst.

2.6 Ellmans Reagens (Testlösung)

Titriplex III (EDTA-Dinatriumsalz)	186,0 mg
DTNB (5.5'-Dithio-bis(-2-nitrobenzoesäure)	4,0 mg

gelöst in 100,0 ml Kaliumphosphatpuffer

2.6.1 Phosphat-Puffer für Testlösung

Kaliumphosphatpuffer pH 7.5

KH_2PO_4	3,32 g
K_2HPO_4	28,67 g
gelöst in	1000,0 ml Aqua bidest.

2.7 Puffer für Ratteninsulinstandard

$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	5,77 g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	1,05 g
Thiomersal	0,24 g
NaCl	6,00 g
Aqua bidest. ad	1000,0 ml

Zur Herstellung der Insulinverdünnung wurde der Puffer mit 6% RSA versetzt.

3. METHODIK

3.1 Methode zur Gewinnung und Isolierung der Langerhansschen Inseln

Die Langerhansschen Inseln wurden nach der von LACY und KOSTIANOVSKY (1967) beschriebenen Methode gewonnen.

3.1.1 Pankreatektomie

Bei der mit Äther narkotisierten Ratte wurde durch einen Schnitt von der Beckenregion bis zum Brustbein und durch Querschnitte unterhalb der Rippenbogen das Abdomen geöffnet. Das Duodenum wurde mit der Pinzette unter dem Leberlappen hervorgezogen, so daß der Ductus pancreaticus sichtbar wurde und kurz vor der Einmündung in die Leber abgebunden werden konnte. Mit einer Klemme wurde das Duodenum zwischen der Einmündung des Ductus und Magen abgeklemmt. In den Ductus pancreaticus wurde nun langsam eisgekühlte Hanks' Lösung (ca. 10.0 ml) injiziert. Das auf diese Weise aufgeblähte Pankreasgewebe war nun sehr gut zu erkennen und konnte vorsichtig mit einer Schere von Magen, Darm, Leber und Milz abgetrennt werden. Das aufgeblähte Organ wurde in einer mit eisgekühlter Hanks' Lösung gefüllten Petrischale von Blut gereinigt und von anhängendem Fettgewebe befreit.

3.1.2 Isolierung der Langerhansschen Inseln

Die Zerkleinerung des Pankreas erfolgte mit einer Schere in möglichst gleichmäßig kleine Teilchen, die sich durch den Konus einer 5 ml-Rekordspritze aufsaugen ließen. Das zerschnittene Pankreasgewebe wurde nun zweimal mit

20 ml eiskalter Hanks' Lösung in einem 25 ml-Meßzylinder gewaschen, wobei noch vorhandene Fettgewebsteile aufschwimmen und mit der überstehenden Hanks' Lösung abgesaugt werden konnten. Die verbliebene Gewebssuspension wurde mit 650 E Collagenase pro g Suspension versetzt und bei 37°C im Meßzylinder mit Hilfe eines Magnetrührers für 2 Min. mit maximaler Drehzahl (ca. 1100/min) und anschließend vorsichtig (60 - 80/min) gerührt. Je nach Aktivität der Collagenase und Zerkleinerungsgrad des Gewebes dauert das insgesamt 14 bis 15 Minuten.

Anschließend wurde die etwas schleimige Gewebssuspension in eine eisgekühlte Petrischale gegeben, durch Zugabe von ca. 5 ml eisgekühlter Hanks' Lösung die Reaktion mit der Collagenase gestoppt und das suspendierte Gewebematerial etwa 15 bis 20 mal langsam durch den Konus einer 10 ml-Rekordspritze hin und her gezogen. Bei diesem Prozeß wurden die Inseln aus dem exokrinen Gewebe herausgerissen; ein für die Inselausbeute entscheidender Vorgang. Die entstandene, sehr feine Suspension wurde in einen mit ca. 10 ml eisgekühlten Hanks' Lösung gefüllten 25 ml-Meßzylinder gegeben.

Die Suspension wurde kräftig aufgewirbelt und zum sedimentieren 5 Min. stehen gelassen. Durch das unterschiedliche spezifische Gewicht von Langerhansschen Inseln und exokrinen Partikeln und der dadurch bedingten größeren Sedimentationsgeschwindigkeit der Inseln wurde deren Isolierung wesentlich erleichtert. Durch mehrmaliges Wiederholen des Sedimentationsvorgangs und Ersetzen des Überstandes durch frische, eisgekühlte Hanks' Lösung konnten die Inseln zum großen Teil vom exokrinen Gewebe befreit werden.

Die erhaltene Suspension wurde in kleine Kristallisierschalen gegeben und die Inseln unter dem Stereomikroskop sorgfältig mit einer Mikropipette ausgelesen. Auf diese Weise wurden durchschnittlich 150 bis 250 Inseln pro Rattenpankreas gewonnen. Die hier beschriebenen Schritte wurden alle unter Eiskühlung durchgeführt.

3.2 Vorinkubation

Zur Vorinkubation wurden die ausgelesenen Inseln in einem 5 ml-Gläschen gesammelt. Die mitgeschleppte Hanks' Lösung wurde vorsichtig abgesaugt und anschließend 2 ml Vorinkubationsmedium (s. 2.5.1) zugegeben. Um den Stoffwechsel der Inseln zu regenerieren, inkubierte man bei 37°C im Wasserbad unter gleichzeitigem Schütteln (50 Bewegungen/min). Während der 30 Min. dauernden Inkubation wurde in das mit einem Gummistopfen verschlossene Gefäß über eine Kanüle Carbogen eingeleitet, um die Sauerstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten. An diese Vorinkubation schloß sich ein dreimaliges Waschen mit eisgekühlter Hanks' Lösung an, um die Inseln von eventuell anhaftendem Insulin zu reinigen. Während des Einsortierens der Inseln für die Hauptinkubation wurde mit eisgekühlter Hanks' Lösung weitergearbeitet.

3.3 Hauptinkubation

3.3.1 Änderungen in der experimentellen Anordnung im Vergleich zum bisher angewandten Versuchsaufbau

Die in unserem Arbeitskreis erarbeitete Methode (ABDELHAMID, 1983; AMMON et al., 1984) zur Bestimmung des Einflusses von Thiolen auf die Glucose-induzierte Insulin-

sekretion bei isolierten Langerhansschen Inseln sah eine Hauptinkubation mit stimulatorischer Glucosekonzentration (11.1 mM) in einem Zeitraum von 40 Min. vor. Nach 30 Min. wurde eine Probe (0.1 ml) zur Insulinbestimmung entnommen und anschließend die Lösung des zu testenden Thiols zugesetzt (0.1 ml), so daß das Volumen des Inkubationsmediums nach wie vor 1.0 ml betrug. Eine weitere Probenentnahme (0.1 ml) schloß sich am Ende der Hauptinkubation an. Aus der Differenz beider Bestimmungen ließ sich dann die Insulinkonzentration für die letzten 10 Min. der Hauptinkubation errechnen.

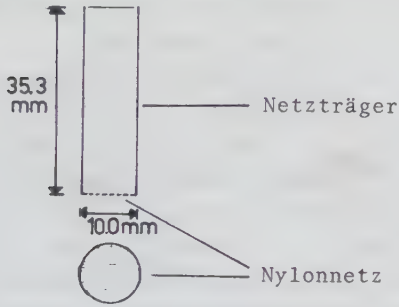
Bedingt durch die zahlreichen Pipettierschritte und durch die Tatsache, daß jedes Probengläschen einzeln mit Carbogen begast werden mußte, war nur eine begrenzte Anzahl von Proben ohne Mithilfe einer zweiten Person zu bewältigen. Als Nachteil erwies sich auch die Ermittlung der Insulinkonzentration durch Differenzbildung aus zwei Bestimmungen.

Es wurden deshalb die im folgenden beschriebenen Änderungen durchgeführt.

3.3.1.1 Reaktions- und Inkubationsgefäße

Zur Durchführung der Hauptinkubation wurden folgende Gefäße verwendet:

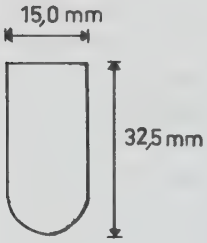
a) Reaktions- oder Netzgefäß



Einem Polystyrol-Reagenzgläschen von 10,0 mm Durchmesser und 40,0 mm Höhe wurde der Boden abgetrennt. An Stelle des Rundbodens wurde ein Nylonnetzblättchen von 10,0 mm Durchmesser und der Maschenweite 54 µm angeklebt. Zehn solcher Netzgefäße konnten in einer Halterung befestigt werden.

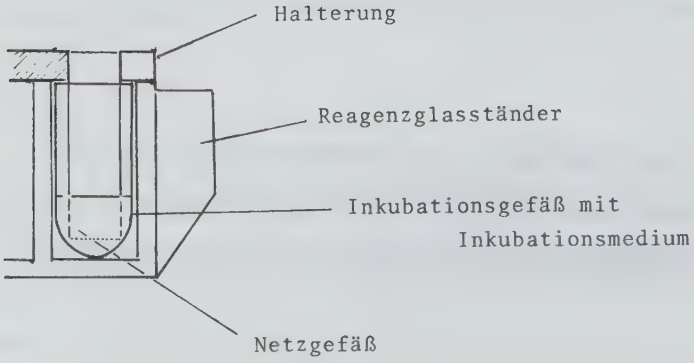
Halterung für Netzgefäße

b) Inkubationsgefäß



Reagenzröhrchen von 15,0 mm Durchmesser und 32,5 mm Höhe aus Polystyrol.
Für jeweils 10 Inkubationsgefäße wurde ein Reagenzglasständer verwendet.

Für die Hauptinkubation wurden dann die Netzgefäße mit den sich auf den Netzen befindenden Inseln (5 Inseln/pro Netzgefäß) in die jeweiligen Inkubationsgefäße gebracht (siehe unten).



Dieses Netzgefäß (a), das in unserem Arbeitskreis entwickelt wurde und in geringfügig anderen Abmessungen bereits bei Arbeiten zur Calciumaufnahme (AMMON et al., 1983), zur Rubidiumaufnahme und auch zur Insulinsekretion (MARK,1983; WAHL,1984) Verwendung fand, hatte auch für die hier zu bearbeitende Fragestellung entscheidende Vorteile.

Befinden sich die isolierten Inseln in diesen Netzgefäßen, so ist es jederzeit möglich, durch Umsetzen der Netzgefäße die Inseln in ein anderes Medium zu bringen. Durch die Wahl der Maschenweite (54 µm) wird gewährleistet, daß die Inkubationsflüssigkeit jederzeit durchtreten kann, ein Verlust von Inseln durch das Netz jedoch verhindert wird.

Durch die zusätzliche Konstruktion der obigen Halterung konnten zehn solcher Netzgefäße gleichzeitig gehandhabt werden; eine Tatsache, die beim Mediumwechsel einen entscheidenden Zeitvorteil mit sich brachte.

3.3.1.2 Ablauf der Hauptinkubation

Vorinkubierte Langerhanssche Inseln (3.2) wurden jeweils in Gruppen von 5 Inseln in ein Netzgefäß einpipettiert. Während des Einpipettierens tauchen die Netzgefäße in eine mit Hanks' Lösung gefüllte Glaswanne ein, so daß die Inseln auch nach dem Einsortieren in die Netzgefäße von eisgekühlter Hanks' Lösung umspült wurden.

Die Hauptinkubation lief nun folgendermaßen ab: Zunächst wurden die Inseln 30 Min. lang im Hauptinkubationsmedium (s. 2.5.2; in Gegenwart von 2.8 bzw. 11.1 mM Glucose) bei 37°C im Wasserbad unter gleichzeitigem Schütteln (100 Bewegungen/min) und Begasen (Carbogen) inkubiert. Die Einzelbegasung der Proben wurde hier durch die gleichzeitige Begasung eines Versuchsansatzes mittels einer Plexiglashaube, in die Carbogen eingeleitet wurde, ersetzt.
Nach dieser Inkubation überführte man die Netzgefäße mit den Inseln in ein vorbereitetes Hauptinkubationsmedium (Glucose 2.8 bzw. 11.1 mM), das bereits auf 37°C erwärmt war und mit Ausnahme des Kontrollwertes jetzt zusätzliche verschiedene Konzentrationen des zu testenden Thiols enthielt.
Dieser zweite Inkubationsschritt wurde nach 10 Min. gestoppt, indem man die Netzgefäße aus dem Medium entfernte. Proben aus diesem Hauptinkubationsmedium wurden für die Insulinbestimmung eingefroren.
Zur Kontrolle der Inselzahl brachte man die Netzgefäße für 15 Min. in eine 0.1%ige Aldehyd-Fuchsin-Lösung. Durch diese Färbe-Technik waren die Inseln sehr gut zu erkennen und ließen sich auch von exokrinem Gewebe unterscheiden.

3.3.2 Zur Wahl der Glucosekonzentrationen

In dieser Arbeit sollte der Einfluß von Thiolen auf die Insulinsekretion sowohl bei stimulatorischer als auch bei substimulatorischer Glucosekonzentration untersucht werden. Für diese Fragestellung mußten deshalb geeignete Glucosekonzentrationen gewählt werden.

Als stimulatorische Konzentration wurde eine Glucosemenge von 2 mg/ml (≙ 11.1 mM) gewählt. Diese Konzentration führt bei der Langerhansschen Insel der Ratte zu einer noch nicht maximal induzierten Insulinsekretion (ASHCROFT et al., 1972b),so daß ein möglicher synergistischer Effekt eines Thiols noch zu erkennen ist, was bei einer maximal stimulierenden Glucosekonzentration nicht mehr der Fall wäre.

Als substimulatorische Konzentration wurde 0.5 mg/ml (≙ 2.8 mM) verwendet, eine Glucosekonzentration, die unterhalb der Schwellenkonzentration für eine stimulierte Sekretion liegt, also nur zur Basalsekretion führen konnte (ASHCROFT et al., 1972b).

3.3.3 Zur Wahl des geeigneten Inkubationszeitraumes

Da die Netzgefäße mit den sich darauf befindenden Inseln bis zum Umsetzen ins Hauptinkubationsmedium in eisgekühlte Hanks' Lösung eintauchten, kann nicht unmittelbar mit Beginn der Hauptinkubation von einer hundertprozentigen Stoffwechselaktivität der Langerhansschen Inseln ausgegangen werden. Es ist deshalb auch nicht sofort mit einer durch Glucose induzierten physiologischen Insulinsekretion zu rechnen.

Diese erste Phase der Hauptinkubation (30 Min.) diente dazu, die Inseln auf die physiologische Temperatur von 37°C zu bringen, sie mit dem nötigen Substrat zu versorgen und damit den Stoffwechsel zu regenerieren.

Die verwendeten Glucosekonzentrationen (s. 3.3.2) führten in dieser Phase zu einer basalen (bei 2.8 mM Glucose) bzw. zu einer noch nicht maximal stimulierten Sekretion von Insulin (bei 11.1 mM Glucose).
Nach Ablauf dieser 30-minütigen Inkubationsphase war nun die Möglichkeit gegeben, den Einfluß von Thiolen auf die Insulinsekretion der Langerhansschen Inseln zu untersuchen, die sich entweder in einem basalen bzw. noch nicht maximal induzierten Sekretionszustand befanden.

Der anschließende 10-minütige Inkubationsabschnitt unter Einfluß des Thiols wurde deswegen so kurz gewählt, da SH-Gruppen, insbesondere in einem mit Carbogen gesättigten Inkubationsmedium, nur eine kurze Zeit stabil sind und sehr schnell in eine oxidierte Form übergehen. Die hier eingesetzten Substanzen unterscheiden sich natürlich hinsichtlich ihrer Stabilität im Inkubationsmedium voneinander. Um aber eine Vergleichbarkeit hinsichtlich ihres Einflusses auf die Insulinsekretion zu gewährleisten, wurden alle untersuchten Thiole über den gleichen Zeitraum von 10 Min. eingesetzt.

3.3.4 Verlauf der durch Glucose (11.1 mM) induzierten Insulinsekretion nach der ersten Phase der Hauptinkubation

I. Bei Wechsel des Mediums nach 30 Min.

Bevor die geänderte Methode zur Prüfung des Einflusses verschiedener Thiole auf die durch Glucose (11.1 mM) induzierte Insulinsekretion angewandt wurde, war es erforderlich, Aufschluß über den Verlauf der Insulinsekretion nach Wechsel des Inkubationsmediums nach der ersten Phase der Hauptinkubation (s. 3.3.1.2) zu erhalten. Dazu wurden die Netzgefäße mit den sich darauf befindenden Inseln nach 30 Min. in ein neues, auf 37°C erwärmtes Inkubationsmedium (11.1 mM Glucose) gebracht und über einen Zeitraum von 30 Min. inkubiert. Sofort nach Umsetzen der Netzgefäße, nach 40, 50 und 60 Min. wurden Proben zur Bestimmung der Insulinkonzentration entnommen.
Die Probenentnahme unmittelbar nach Umsetzen der Netzgefäße sollte Aufschluß über die eventuell ins neue Medium eingeschleppte Insulinmenge bringen. Die Inkubationsflüssigkeit hat, bedingt durch den Gehalt an Rinderserumalbumin, eine geringere Oberflächenspannung als Wasser. Dadurch bleibt beim Herausnehmen des Netzgefäßes bis auf einen Benetzungsfilm auf den Eintauchflächen keine Inkubationsflüssigkeit im Netzgefäß zurück. Auf ein Absaugen dieser Restflüssigkeit mit Zellstoff wurde verzichtet, um erstens die Inseln auf dem Netz nicht "trockenzulegen" und damit möglicherweise zu beschädigen und zweitens um auch die Benetzbarkeit bei Einbringen in ein neues Medium zu gewährleisten.

II. Bei Weiterinkubation im gleichen Inkubationsmedium

Im Vergleich dazu wurde in einer parallel laufenden Ver-

suchsreihe die durch Glucose (11.1 mM) induzierte Insulinsekretion bei Weiterinkubation ohne Erneuerung des Mediums nach 30 Min. verfolgt. Auch hier wurden zum Vergleich nach 30, 40, 50 und 60 Min. Proben für die Insulinbestimmung entnommen.

Aus den erhaltenen Insulinkonzentrationen - dargestellt in Abb. 3.1 und Tab. 3.1 - kann folgendes entnommen werden:

a) Bei Weiterinkubation im selben Medium (II.) erhält man im gemessenen Zeitraum (30. bis 60. Min.) einen nahezu linearen Anstieg in einem Bereich zwischen 208.0 ± 20.7 bis 362.0 ± 38.0 µE/ml. Der Anstieg erfolgt von einem höheren Insulinniveau aus, weil sich in der ersten Phase der Hauptinkubation bereits eine gewisse Insulinmenge angesammelt hat.

b) Nach Wechsel in neues Medium (I.) kann man einen starken Anstieg (von 13.7 ± 3.5 auf 110.0 ± 32.4 µE/ml) der Glucose-induzierten Sekretion zwischen der 30. und 40. Min. erkennen. Ab der 40. Min. erhält man ein etwas abgeschwächteres aber dennoch nahezu lineares Ansteigen der Insulinsekretion. Der Sekretionsverlauf ab diesem Zeitpunkt zeigt eine Parallelität zum Verlauf der Sekretion beim bisher angewandten Versuchsablauf (II.). Die Insulinmenge, die sofort nach Umsetzen der Netzgefäße gemessen wurde, ist gering und konnte bei weiteren Untersuchungen (s. 3.3.5) noch verringert werden.

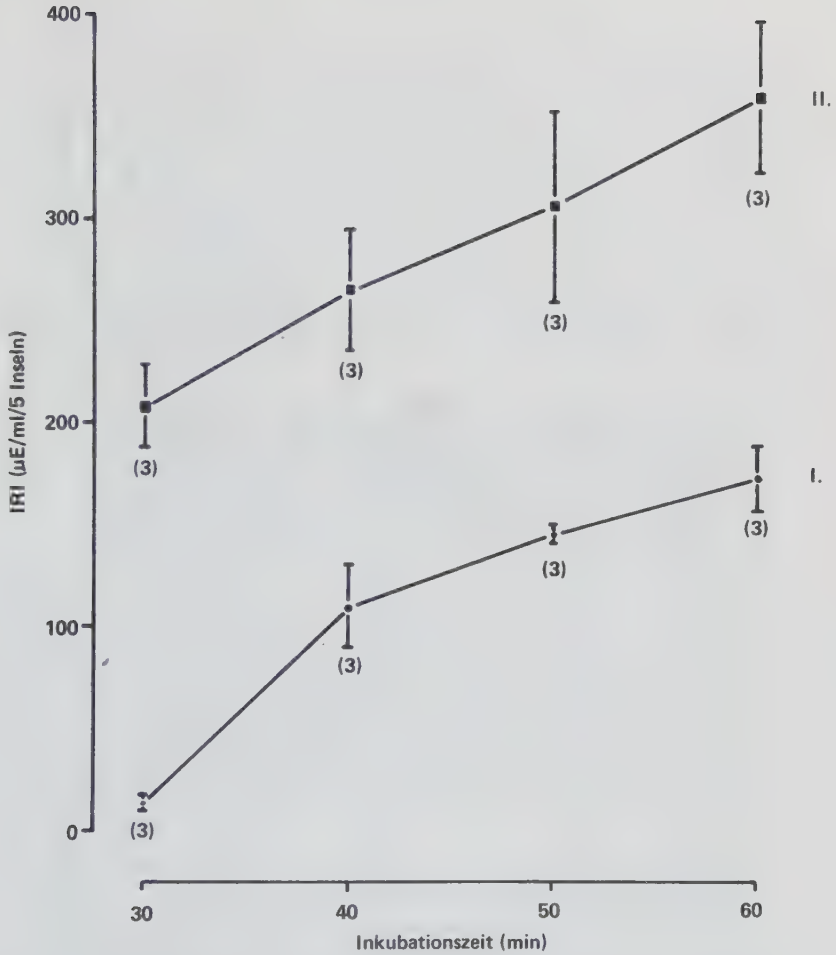


Abb. 3.1: Verlauf der durch Glucose (11.1 mM) induzierten Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit: I. Bei Wechsel des Mediums nach 30 Min. II. Bei Weiterinkubation im gleichen Medium.

Gruppen von je 5 Inseln pro Netzgefäß wurden insgesamt 60 Min. in 1.0 ml KRB-Lösung (+ 2% RSA) mit Glucose (11.1 mM) bei 37°C im Wasserbad unter Carbogenbegasung inkubiert. In einer Versuchsreihe (I.) wurde nach 30 Min. das Inkubationsmedium durch frisches Medium (gleiche Parameter) ersetzt. Nach 30, 40, 50 und 60 Min. wurden Proben für die Insulinbestimmung entnommen.

Anzahl der Versuche (n) in Klammern Mittelwerte ± SEM

Tab. 3.1: Verlauf der durch Glucose (11.1 mM) induzierten Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit: I. bei Wechsel des Mediums nach 30 Min.; II. bei Weiterinkubation im gleichen Medium.

	Insulin (µE IRI/ml/5 Inseln)			
	Inkubationszeit (min)			
	30	40	50	60
I.	13.7 ± 3.5 (3)	110.0 ± 32.4 (3)	146.3 ± 3.0 (3)	174.3 ± 16.8 (3)
II.	208.3 ± 20.7 (3)	266.0 ± 30.3 (3)	308.0 ± 46.9 (3)	362.0 ± 38.0 (3)

Gruppen von je 5 Inseln pro Netzgefäß wurden insgesamt 60 Min. in 1.0 ml KRB-Lsg. (+ 2% RSA) mit Glucose (11.1 mM) bei 37°C im Wasserbad unter Carbogenbegasung inkubiert. In einer Versuchsreihe (I.) wurde nach 30 Min. das Inkubationsmedium durch frisches Medium (gleiche Parameter) ersetzt. Nach 30, 40, 50 und 60 Min. wurden Proben für die Insulinbestimmung entnommen.

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mittelwerte ± SEM

Diese vergleichende Untersuchung zeigt, daß bei Zusatz eines Thiols ab der 30. Min. bei dem bisher angewandten Ablauf der Inkubation (II.) nur mit einer Differenzbildung zwischen zwei Insulinkonzentrationen gearbeitet werden konnte. Bei Umsetzen der Netzgefäße (I.) reicht nun eine Probenentnahme je nach Wahl der Inkubationszeit nach 40, 50 oder auch 60 Min. aus. Damit konnte die Fehlerquelle, die eine Differenzbildung aus zwei gemessenen Werten immer mit sich bringt, ausgeschaltet werden.

3.3.5 Verlauf der Insulinsekretion bei stimulatorischer (11.1 mM) und substimulatorischer (2.8 mM) Glucosekonzentration in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei Wechsel des Mediums nach 30 Min.

Neben dem Einfluß von Thiolen auf die Insulinsekretion bei stimulatorischer Glucosemenge sollte auch auf eine mögliche Eigenwirkung SH-Gruppen-haltiger Substanzen bei substimulatorischer Glucosekonzentration (2.8 mM) geprüft werden. Dazu war es notwendig, vor Zusatz eines Thiols die Höhe und den Verlauf der Basalsekretion im Vergleich zu einer stimulierten Sekretion zu ermitteln.

Betrachtet man die in Abb. 3.2 und Tab. 3.2 dargestellten Befunde, so kann bereits nach 10 Min. eine sehr deutliche Differenz zwischen basaler (32.0 µE) und stimulierter Sekretion (70.7 µE) festgestellt werden. Die basale Sekretion wird schon nach der 50. Min. nur noch unwesentlich erhöht, während die durch 11.1 mM Glucose stimulierte Sekretion kontinuierlich im hier gemessenen Bereich ansteigt. Dadurch wird die Differenz zwischen basaler und stimulierter Sekretion in Abhängigkeit von der Inkubationszeit immer größer.

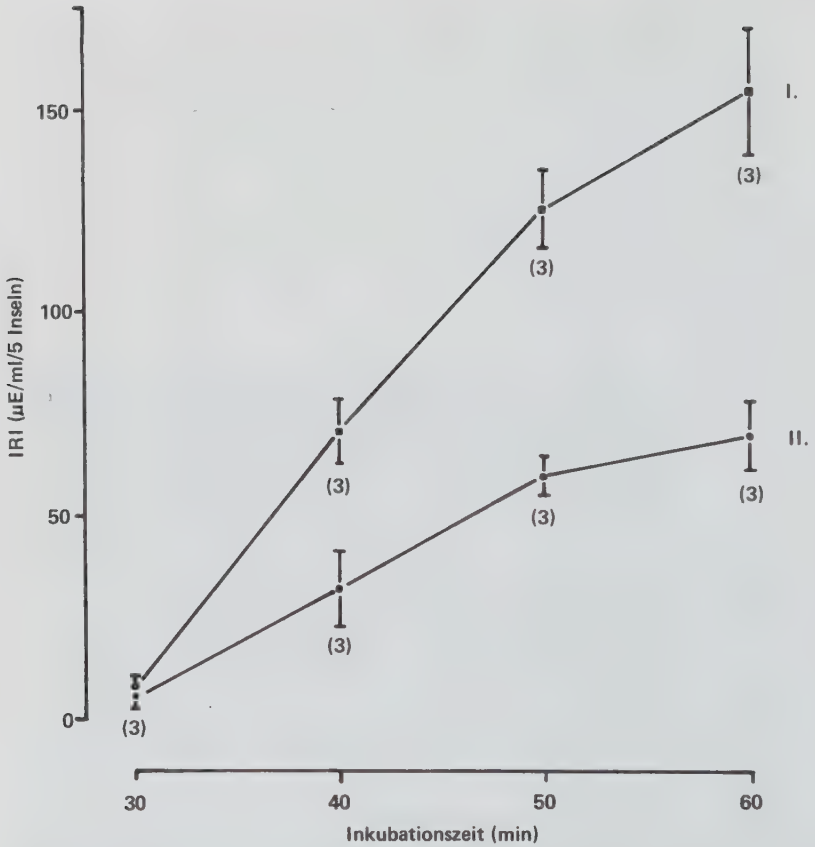


Abb. 3.2: Verlauf der Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei Wechsel des Mediums nach 30 Min.: I. Bei stimulatorischer Glucosekonzentration (11.1 mM); II. Bei substimulatorischer Glucosekonzentration (2.8 mM).

Gruppen von je 5 Inseln pro Netzgefäß wurden insgesamt 60 Min. in 1.0 ml KRB-Lösung (+ 2% RSA) mit Glucose (2.8 bzw. 11.1 mM) bei 37°C im Wasserbad unter Carbogenbegasung inkubiert. Nach 30 Min. wurde das Inkubationsmedium durch frisches Medium (gleiche Parameter) ersetzt. Proben für die Insulinbestimmung wurden sofort nach Mediumwechsel, nach 40, 50 und 60 Min. entnommen.

Anzahl der Versuche (n) in Klammern Mittelwerte ± SEM

Tab. 3.2: Verlauf der Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei Wechsel des Mediums nach 30 Min.: I. bei stimulatorischer Glucosekonzentration (11.1 mM); II. bei substimulatorischer Glucosekonzentration (2.8 mM)

	Insulin (µE IRI/ml/5 Inseln)			
	Inkubationszeit (min)			
	30	40	50	60
I. Glucose 11.1 mM	8.0 ± 2.6 (3)	70.7 ± 8.3 (3)	125.0 ± 9.9 (3)	153.7 ± 15.7 (3)
II. Glucose 2.8 mM	5.7 ± 2.8 (3)	32.0 ± 9.5 (3)	59.7 ± 5.2 (3)	69.7 ± 8.5 (3)

Gruppen von je 5 Inseln pro Netzgefäß wurden insgesamt 60 Min. in 1.0 ml KRB-Lsg. (+ 2% RSA) mit Glucose (2.8 bzw. 11.1 mM) bei 37°C im Wasserbad unter Carbogenbegasung inkubiert. Nach 30 Min. wurde das Inkubationsmedium durch frisches Medium (gleiche Parameter) ersetzt. Proben für die Insulinbestimmung wurden sofort nach Mediumwechsel, nach 40, 50 und 60 Min. entnommen.

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mittelwerte ± SEM

3.3.6 Schlußfolgerungen

Bereits nach einem Inkubationszeitraum von 10 Min., und über einen solchen Zeitraum sollten die Thiole zugesetzt werden, kann sehr deutlich zwischen basaler und stimulierter Sekretion unterschieden werden. Das zeigt, daß die hier angewandte Inkubationsmethode für die Bearbeitung der Fragestellung sehr gut geeignet ist. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 20 oder 30 Min. wäre, wie die hier gemachten Befunde zeigen, noch vorteilhafter für die Unterscheidung zwischen basaler und stimulierter Sekretion. Leider besteht aber bei der Instabilität der Thiole im verwendeten Inkubationsmedium die Gefahr, daß mögliche Effekte, die von freien SH-Gruppen ausgehen, über einen längeren Inkubationszeitraum nicht mehr zu erkennen wären, bzw. durch mögliche Hemmwirkungen von entstehenden Disulfiden wieder ausgeglichen würden.

Die sofort nach Wechsel in neues Medium gemessene geringfügige Insulinkonzentration ist zum Teil wohl auch auf an den Inseln haftendes Insulin zurückzuführen, das beim Eintauchen in neues Medium sofort abgegeben wird.
Eine weitere Ursache, das Einschleppen von Benetzungsflüssigkeit, konnte durch vorsichtiges Herausnehmen der Netzgefäße aus dem ersten Medium und dadurch bedingtes fast vollständiges Abfließen der Inkubationslösung aus dem Netzgefäß noch reduziert werden. Insgesamt gesehen ist diese Insulinmenge so gering (< 10 µE), daß sie auf die Versuchsergebnisse keinen Einfluß hat.

Der stärkere Anstieg der durch Glucose (11.1 mM) induzierten Insulinsekretion in den ersten 10 Min. nach Umsetzen in neues Medium (Abb. 3.1) im Vergleich zur Versuchsreihe ohne Mediumwechsel ist wohl auf das frisch vorbe-

reitete neue Medium zurückzuführen, das außerdem kein Insulin enthielt, so daß eine mögliche Feed-back-Hemmung auf die Sekretion ausgeschlossen werden kann.

3.4 Radioimmunologische Bestimmung von Insulin

Die Bestimmung der Insulinkonzentration im Medium wurde durch Radioimmunoassay nach der Doppel-Antikörper-Methode von SOELDNER u. SLONE (1965) mit dem INSIK-1-Kit durchgeführt.

3.4.1 Einfluß von Thiolen auf den Radioimmunoassay

Die Bedeutung der Disulfidbrücken auf die Formkonstanz und die Stabilität des Insulinmoleküls ist nicht unerheblich. Von verschiedenen Thiolen ist jedoch bekannt, daß sie mit Disulfiden Austauschreaktionen eingehen bzw. zur reduktiven Spaltung von Disulfidbrücken führen (JOCELYN, 1972). Auch die hier eingesetzten Thiole sind möglicherweise in der Lage, durch Angriff auf die Disulfidbrücken die Struktur des Insulinmoleküls zu zerstören, was mit dem Verlust der Immunoreaktivität einhergeht. Reaktionen der Thiole mit dem Insulinantikörper sind ebenfalls denkbar. Es ist deshalb unumgänglich, den Einfluß der jeweiligen Thiolkonzentrationen bei der Erstellung der Eichgeraden zu berücksichtigen.

3.4.2 Durchführung der Bestimmung

Um die Insulinkonzentration bestimmen zu können, wurde eine Verdünnungsreihe mit Ratteninsulin hergestellt (0, 25, 50, 100, 200, 400, 600 µE Insulin/ml). Um den Einfluß der Thiole auf den Radioimmunoassay zu korrigieren, wurden die Verdünnungsreihen bei der betreffenden

Thiolkonzentration erstellt. Die Proben für die Eichkurven (Kontrolle und Proben mit Thiolkonz.) wurden analog zum Versuch 10 Min. bei 37°C unter Carbogenbegasung inkubiert, ein Teil entnommen und bis zur Bestimmung eingefroren.

Den aufgetauten Proben (Eich- und Versuchsproben) wurden je 20 µl entnommen und in zuvor durchnummerierte Polystyrolröhrchen einpipettiert. Da die Insulinkonzentrationen für die hier gewählte Bestimmungsmethode noch zu hoch waren, wurde mit jeweils 80 µl des folgenden Puffers (pH 7.4) verdünnt.

$Na_2PHO_4 \cdot 2H_2O$	2,120 g
EDTA $\cdot 2H_2O$ (Na-Salz)	0,745 g
Rinderserumalbumin	0,200 g
gelöst in	200,0 ml Aqua bidest.

Zu den durch diesen Verdünnungsschritt erhaltenen Proben gab man je 100 µl des nach Vorschrift gelösten Insulinbindungsreagens. Nach vorsichtigem Umschütteln wurde bei 4°C für 6 Stunden inkubiert.
Anschließend wurde das gelöste ^{125}I-markierte Insulin (100 µl) zupipettiert und weitere 18 Stunden bei 4°C inkubiert.

Nach Verdünnen jeder Probe mit 1.0 ml des obigen Phosphatpuffers wurden alle Teströhrchen 15 Min. bei 4000 U/min unter Kühlung zentrifugiert, so daß anschließend der Überstand von dem am Boden haftenden Doppelantikörperkomplex abdekantiert werden konnte. Noch am Gefäß haftende Flüssigkeit wurde vorsichtig mit einer Kanüle abgesaugt und die Proben in einem Gamma-Counter gezählt (1 min).

3.4.3 Auswertung

Aus den vom Gamma-Counter erhaltenen Zählraten wurde für jede zu bestimmende Probe die Durchschnittszählrate (aus drei Werten bei den Eichgeraden, aus zwei Werten bei den zu messenden Proben) errechnet. Aus den Durchschnittszählraten (cpm) der Eichproben konnte mit Hilfe eines Computerprogramms die Eichkurve erstellt werden, die mit einem angeschlossenen Plotter gezeichnet wurde. Nach Eingeben der Zählraten der zu messenden Probe wurde der dazugehörige Insulinwert an dieser Eichkurve abgegriffen und ausgedruckt.

Um den Einfluß von Thiolen auf den Radioimmunoassay besser zu erkennen und um einen Vergleich zwischen den verschiedenen Konzentrationen eines Thiols ziehen zu können, wurde die jeweilige Eichkurve in eine Eichgerade überführt.
Man bildete den Quotienten C_o/C_x sowohl bei den Eichproben, wie bei den unbekannten Proben, wobei C_o die Zählrate (cpm) des an den Antikörper gebundenen ^{125}I-Insulins in Abwesenheit (o) und C_x die Zählrate in Anwesenheit (x) von Ratteninsulin ist.
Die Eichgerade wurde ebenfalls über ein Computerprogramm errechnet. Die Quotienten C_o/C_x wurden in Abhängigkeit von den bekannten Insulinkonzentrationen (x) aufgetragen. Durch Vergleich der Eichgeraden bei verschiedenen Konzentrationen eines Thiols konnten nun Aussagen über den Einfluß von Thiolen auf die Insulinkonzentration in Abhängigkeit von der Thiolkonzentration gemacht werden.

3.5 Bestimmung der freien SH-Gruppe im Inkubationsmedium

Aus bisher durchgeführten Untersuchungen (HELLMAN, 1975b; AMMON et al., 1984) ist bekannt, daß SH-Gruppen insbesondere in einem mit Carbogen gesättigten Inkubationsmedium sehr leicht oxidierbar sind. Deshalb war es notwendig, Aufschluß über den Verlauf der Abnahme der freien SH-Gruppen des verwendeten Thiols zu erhalten.

Zur Bestimmung des Thiolgehaltes im Inkubationsmedium wurde eine von ELLMAN (1959) publizierte Methode angewandt. Dieses spektrophotometrische Verfahren beruht auf der Reduktion der Disulfid-Bindung der 5.5.'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (ELLMANS Reagens, DTNB) durch freie SH-Gruppen.
Die Messungen erfolgten in Anlehnung an einen von CIKRYT (1979) beschriebenen Versuchsansatz.

Die mit Reagens (s. 2.6) versetzte Probe wurde im Spektralphotometer bei 412 nm gegen eine gleich behandelte Probe ohne Thiol gemessen. Aus der erhaltenen Extinktion wurde die Thiolkonzentration wie folgt berechnet:

$$C = \frac{A}{E} D$$

C = gesuchte Konzentration des Thiols

A = gemessener Extinktionswert bei 412 nm

E = Extinktionskoeffizient 13.6/M/cm

D = Verdünnungsfaktor

3.6 Statistische Auswertung

Die in den Abbildungen und Tabellen dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte $\pm$ SEM (standard error of the mean = mittlerer Fehler des Mittelwertes).
Die Berechnungen basieren auf der in Klammern angegebenen Zahl der Versuche (n).
Da bei den Thiolbestimmungen die biologische Variabilität entfällt und außerdem die Streuung der Meßergebnisse sehr gering ist, wurde auf eine Angabe des SEM-Wertes verzichtet.
Der t-Test nach STUDENT wurde zur statistischen Prüfung auf Unterschiede zwischen Mittelwerten von Kontroll- und Versuchsgruppen angewandt. Bei p-Werten gleich und kleiner als 5% ($p < 0.05$) wurden die Versuche als signifikant bewertet.

4. E R G E B N I S S E

4.1 Glutathion reduziert (GSH)

4.1.1 Konzentrationsänderungen im Inkubationsmedium

Wie aus Abb. 4.1 und Tab. 4.1 zu erkennen ist, kommt es im Verlauf der 60-minütigen Inkubation zu einer sehr starken Abnahme der freien SH-Gruppe bei beiden eingesetzten GSH-Konzentrationen (bei 0.1 mM nach 60 Min. noch 18.1%, bei 1.0 mM noch 8.7% der bei Beginn der Inkubation vorhandenen Konz.). Die prozentuale Abnahme verläuft bis zur 20. Min. bei beiden Konzentrationen fast identisch. Danach kommt es bei der höheren Konzentration (1.0 mM) zu einem stärkeren prozentualen Abfall. Nach 10 Min. verfügt man noch über 82.6% (bei 0.1 mM) bzw. 79.1% (bei 1.0 mM) der Ausgangskonzentration.

4.1.2 Einfluß auf den Verlauf der Eichgeraden des Insulin-Radioimmunoassays

Betrachtet man die in Abb. 4.2 dargestellten Eichgeraden, so erkennt man einen fast identischen Verlauf der Eichgeraden ohne GSH und bei 0.1 mM GSH. Eine Beeinflussung der Eichgeraden in einem Konzentrationsbereich $\leq$ 0.1 mM ist daher nicht gegeben, während Konzentrationen von 0.5 mM und 1.0 mM dosisabhängig die Steigung der Eichgeraden verringern.
Diese dosisabhängige Abnahme der Eichgeraden-Steigung veranschaulicht einen Verlust des jeweils eingesetzten Eichinsulins, der berechnet werden kann. Bei 0.5 mM findet man noch 87.0%, bei 1.0 mM noch 66.3% der jeweiligen Eichkonzentrationen. Je größer die Verluste an Insulin sind, um so ungenauer wird die Bestimmung von Versuchsproben.

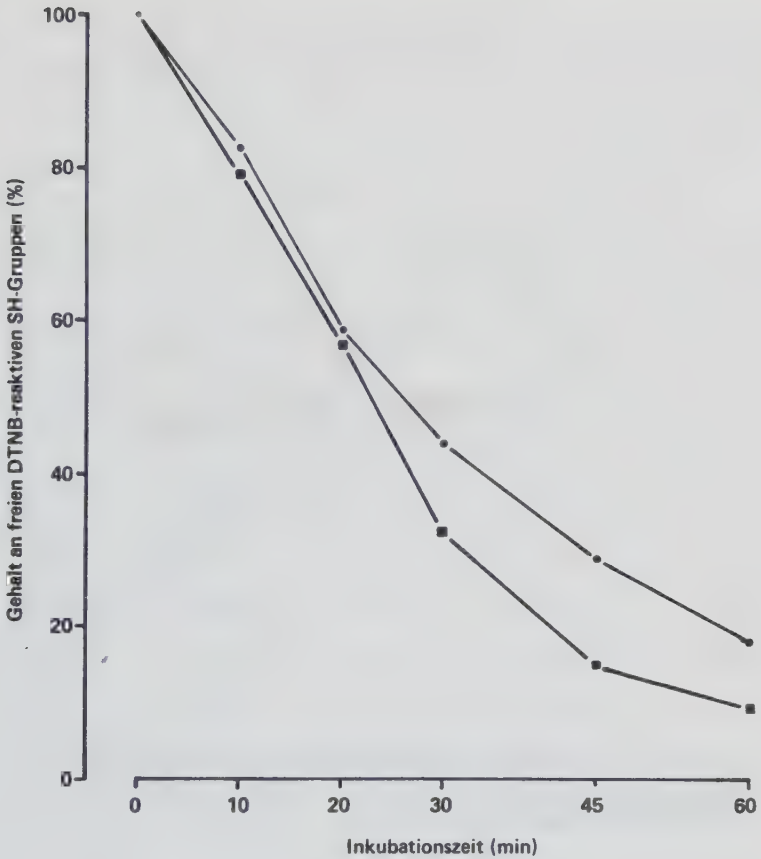


Abb. 4.1: Konzentrationsänderungen von reduziertem Glutathion (GSH) im Inkubationsmedium in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Inkubationsmedium (KRB-Lsg. + 2% RSA, pH 7,35) mit der entsprechenden Ausgangskonzentration von GSH (● ——— ● 0.1 mM; ■ ——— ■ 1.0 mM) wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt (≙ 0 min) und anschließend mit Carbogen begast. Nach 0, 10, 20, 30, 45 und 60 Min. wurden Proben entnommen und über die Bestimmung der freien SH-Gruppe (ELLMAN, 1959) die Konzentration von GSH ermittelt.

Angabe in % der Ausgangskonzentration (0 min)

Dargestellte Ergebnisse beruhen auf Mittelwerten aus drei Versuchen.

Tab. 4.1: Konzentrationsänderungen von reduziertem Glutathion (GSH) im Inkubationsmedium in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

	GSH			
	0.1 mM		1.0 mM	
Kontrolle[1] (mM)	0.0979		0.999	
Zeit (min)	mM	%	mM	%
0	0.0946	100.0	0.990	100.0
10	0.0781	82.6	0.783	79.1
20	0.0557	58.9	0.563	56.9
30	0.0419	44.3	0.321	32.4
45	0.0275	29.1	0.149	15.1
60	0.0171	18.1	0.086	8.7

[1] sofort nach Lösen des Thiols im Inkubationsmedium (0°C) gemessene Konzentration

Inkubationsmedium (KRB-Lsg. + 2% RSA, pH 7.35) mit der entsprechenden Ausgangskonzentration (0.1 mM; 1.0 mM) von GSH wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt (≙ 0 min) und anschließend mit Carbogen begast. Nach den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und über die Bestimmung der freien SH-Gruppe (ELLMAN, 1959) die Konzentration von reduziertem Glutathion ermittelt.

Ergebnisse beruhen auf Mittelwerten aus drei Versuchen.

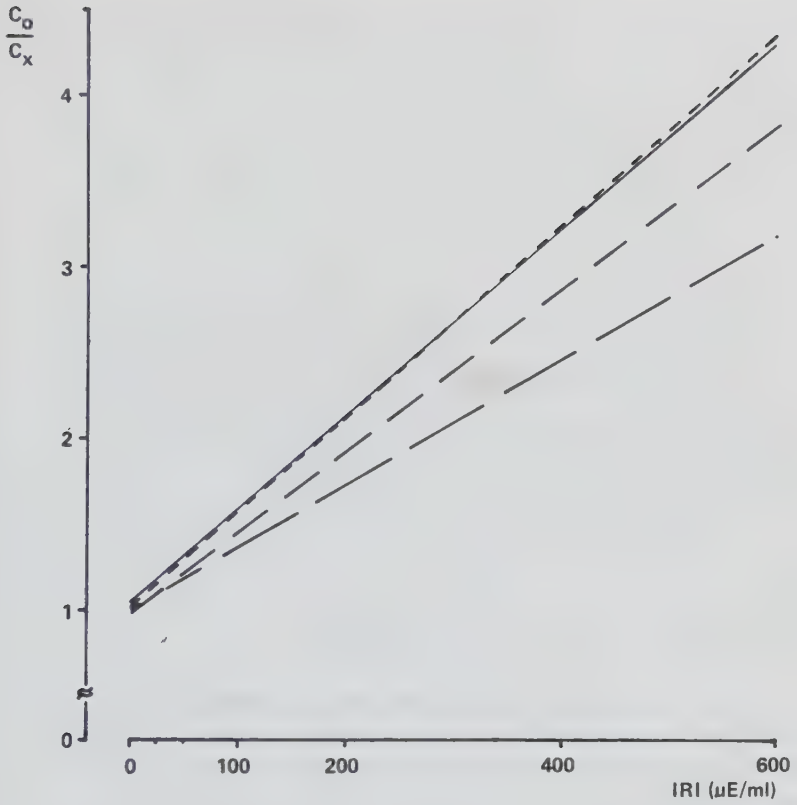


Abb. 4.2: Einfluß von reduziertem Glutathion (GSH) auf den Verlauf der Eichkurven des Insulin-Radioimmunoassays.

——————— Kontrolle (r = 0.992)
- - - - - - - - - - GSH 0.1 mM (r = 0.988)
—— —— —— GSH 0.5 mM (r = 0.999)
——— ——— GSH 1.0 mM (r = 0.998)

C_o = Bezugswert (Radioaktivität des an den Antikörper gebundenen ^{125}I-Insulins in Abwesenheit (o) von Ratteninsulin)

C_x = Meßwert (Radioaktivität des an den Antikörper gebundenen ^{125}I-Insulins in Anwesenheit (x) von Ratteninsulin)

Bei einer GSH-Konzentration von 1.0 mM bedeutet die Verwendung dieser Eichgerade eine Korrektur der tatsächlich vorhandenen Insulinkonzentration um den Faktor 1.51 (100/66.3) was einer Erhöhung der Insulinwerte um 51% entspricht.
Für die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve wurde deshalb von GSH als höchste Konzentration 0.5 mM eingesetzt.

4.1.3 Einfluß von GSH auf die Insulinsekretion bei stimulatorischer (11.1 mM) und substimulatorischer (2.8 mM) Glucosekonzentration

Aus bisher durchgeführten Untersuchungen ist bekannt, daß GSH die Glucose-induzierte Insulinsekretion noch zu steigern vermag (s. 1.1.3).
So wurde bei der Inkubation isolierter Inseln von ob/ob-Mäusen (HELLMAN et al., 1975b) und von Wistar-Ratten (AMMON et al., 1984) eine Potenzierung der Glucose-induzierten Sekretion von Insulin beobachtet.
Auch bei Zusatz von GSH zum Perfusionsmedium reagierte der isoliert-perfundierte Pankreas unter stimulatorischer Glucosekonzentration mit einer gesteigerten Insulinfreisetzung. Wurde in dieser Versuchsanordnung eine nicht stimulierende Glucosekonzentration verwendet, so kam es auch unter GSH-Zusatz nicht zur beschriebenen Potenzierung (AMMON u. ABDEL HAMID, 1981).

Die hier zitierten Befunde sollten mit Hilfe des optimierten Versuchsaufbaus (s. 3.3) bestätigt und durch die Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve bei stimulatorischer und substimulatorischer Glucosekonzentration vervollständigt werden.

Aus den Ergebnissen, dargestellt in Abb. 4.3 und Tab. 4.2 kann nun folgendes entnommen werden:

a) GSH führt in einem Konzentrationsbereich von 0.01 - 0.50 mM zu einer signifikanten ($p < 0.005$) Steigerung der Insulinsekretion bei einer Glucosekonzentration von 11.1 mM (I.). Das Wirkungsmaximum dürfte bei einer GSH-Konzentration von 0.1 mM erreicht sein, womit bisherige In-vitro-Befunde bestätigt werden konnten.

b) Bei einem basalen Sekretionszustand (II.) führt GSH nicht zu einem Ansteigen der Insulinausschüttung. Die unter Einfluß der dargestellten GSH-Konzentrationen erhaltenen Ergebnisse liegen alle im Bereich einer basalen Insulinsekretion (s. Kontrolle).

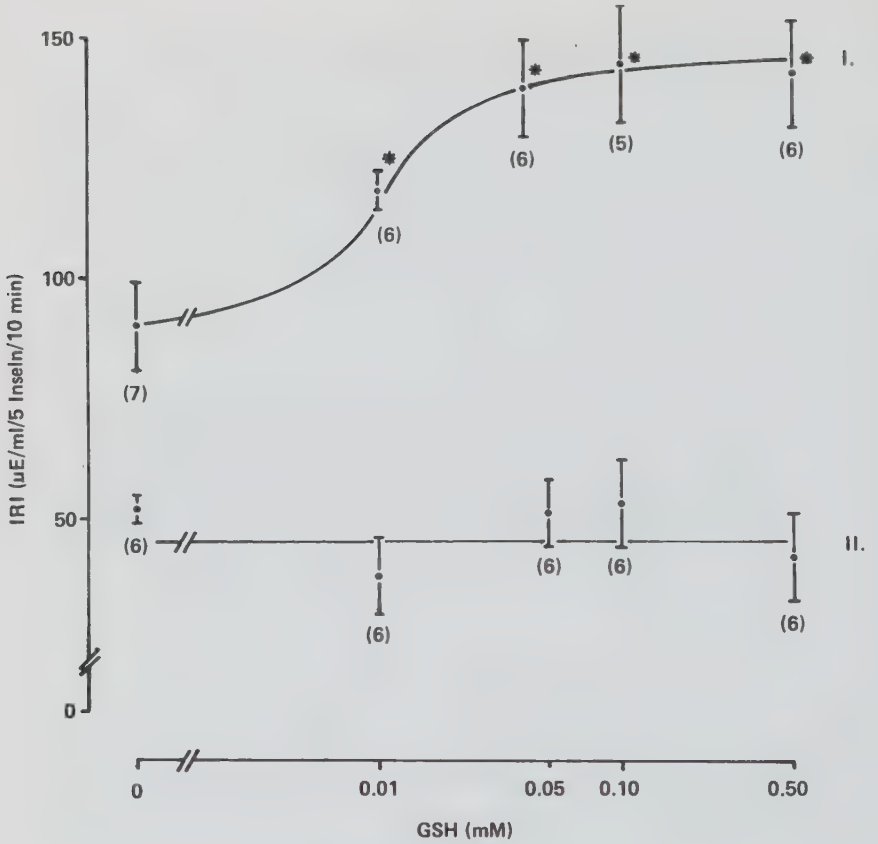


Abb. 4.3: Einfluß von reduziertem Glutathion (GSH) auf die Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte: I. Bei stimulatorischer Glucosekonzentration (11.1 mM); II. Bei substimulatorischer Glucosekonzentration (2.8 mM).

Gruppen von je 5 Inseln pro Netzgefäß wurden 30 Min. in 1.0 ml KRB-Lösung (+ 2% RSA) mit Glucose (2.8 bzw. 11.1 mM) bei 37°C im Wasserbad unter Carbogenbegasung inkubiert, anschließend das Medium gewechselt und unter Einfluß der dargestellten GSH-Konzentrationen bei sonst gleichbleibenden Bedingungen 10 Min. weiterinkubiert.

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mittelwerte ± SEM

t-Test: $*p < 0.005$

Tab. 4.2: Einfluß von reduziertem Glutathion (GSH) auf die Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte: I. bei stimulatorischer Glucosekonzentration (11.1 mM); II. bei substimulatorischer Glucosekonzentration (2.8 mM).

	Insulin (µE IRI/ml/5 Inseln/10 min)				
		GSH (mM)			
		0.01	0.05	0.10	0.50
I. Glucose 11.1 mM	79.7 ± 9.4 (7) A	118.0 ± 3.8 (6) B	139.0 ± 10.2 (6) C	143.8 ± 11.8 (5) D	141.8 ± 10.6 (6) E
II. Glucose 2.8 mM	51.5 ± 2.9 (6) F	37.8 ± 7.6 (6) G	51.3 ± 6.5 (6) H	52.5 ± 9.0 (6) I	41.7 ± 8.6 (6) J

Gruppen von je 5 Inseln pro Netzgefäß wurden 30 Min. in 1.0 ml KRB-Lsg. (+ 2% RSA) mit Glucose (2.8 bzw. 11.1 mM) bei 37°C im Wasserbad unter Carbogenbegasung inkubiert, anschliessend das Medium gewechselt und unter Einfluß der dargestellten GSH-Konzentrationen bei sonst gleichbleibenden Bedingungen 10 Min. weiterinkubiert.

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mittelwerte ± SEM

t-Test: AB, AC, AD, AE } $p < 0.005$ FG, FH, FI, FJ } n.s.

4.2 N-Acetyl-L-cystein

4.2.1 Konzentrationsänderungen im Inkubationsmedium

Aus den Werten, dargestellt in Abb. 4.4 und Tab. 4.3 kann folgendes entnommen werden:
Im Verlauf der Inkubationsdauer (60 Min.) kommt es bei beiden getesteten Konzentrationen zu einer etwa 50%igen Konzentrationsabnahme (bei 0.1 mM Abnahme auf 48.3%; bei 1.0 mM Abnahme auf 51.1%).
Bis zur 20. Min. sieht man bei 0.1 millimolarer Ausgangskonzentration im Vergleich zur 10-fach höheren Konzentration einen stärkeren prozentualen Abfall.
Die erhaltenen Werte nach 10-minütiger Inkubation betragen: 89.5% (bei 0.1 mM) bzw. 94.5% (bei 1.0 mM) der Ausgangskonzentration.

4.2.2 Einfluß auf den Verlauf der Eichgeraden des Insulin-Radioimmunoassays

Die in Abb. 4.5 dargestellten Eichgeraden lassen folgende Schlußfolgerungen zu:
In einem Konzentrationsbereich $\leq$ 0.1 mM wird die Eichgerade von N-Acetyl-L-cystein nicht beeinflußt.
Eine Konzentration von 0.5 mM zeigt jedoch eine sichtbare Verringerung der Steigung, was bereits einem Verlust von 16.3% der Eichkonzentrationen entspricht.
Bei einer Konzentration von 1.0 mM werden 71.3% des für die Eichproben eingesetzten Insulins radioimmunologisch nicht mehr erfaßt, was in der sehr starken Abflachung der Eichgeraden zum Ausdruck kommt. Eine Verwendung dieser Konzentration zur Untersuchung eines möglichen Einflusses auf die Insulinsekretion (s. 4.2.3) war deshalb nicht mehr möglich. Für die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve war somit der Konzentrationsbereich (0 - 0.5 mM) festgelegt.

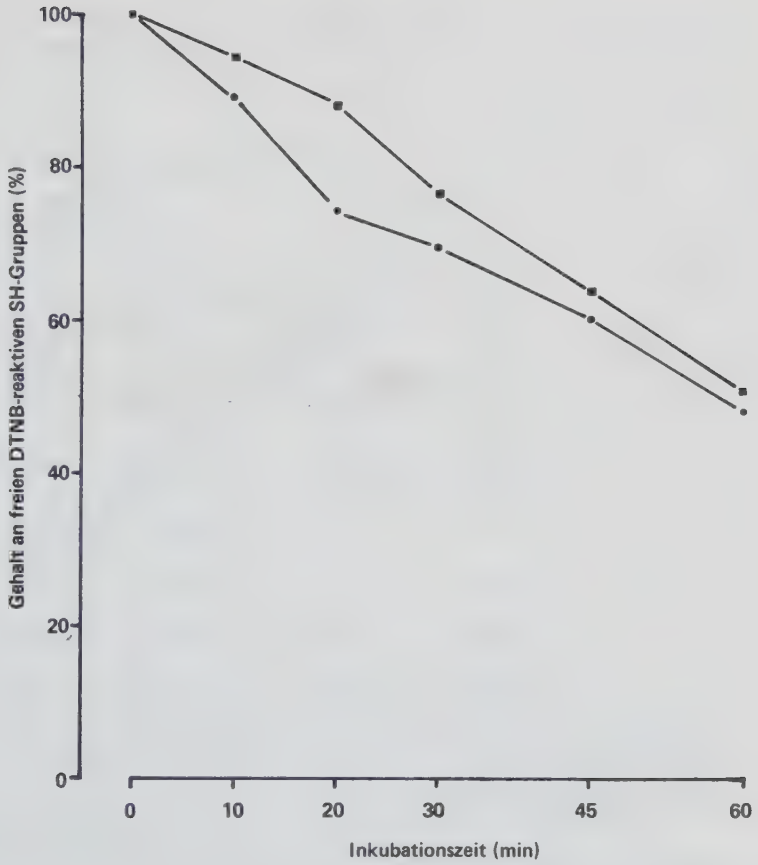


Abb. 4.4: Konzentrationsänderungen von N-Acetyl-L-cystein im Inkubationsmedium in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Inkubationsmedium (KRB-Lsg. + 2% RSA, pH 7,35) mit der entsprechenden Ausgangskonzentration von N-Acetyl-L-cystein (● ——— ● 0.1 mM; ■ ——— ■ 1.0 mM) wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt (≙ 0 min) und anschließend mit Carbogen begast. Nach 0, 10, 20, 30, 45 und 60 Min. wurden Proben entnommen und über die Bestimmung der freien SH-Gruppe (ELLMAN, 1959) die Konzentration von N-Acetyl-L-cystein ermittelt.

Angabe in % der Ausgangskonzentration (0 min)

Dargestellte Ergebnisse beruhen auf Mittelwerten aus drei Versuchen.

Tab. 4.3: Konzentrationsänderungen von N-Acetyl-L-cystein im Inkubationsmedium in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

	N-Acetyl-L-cystein			
	0.1 mM		1.0 mM	
Kontrolle[1] (mM)	0.1001		1.056	
Zeit (min)	mM	%	mM	%
0	0.0979	100.0	1.049	100.0
10	0.0876	89.5	0.991	94.5
20	0.0729	74.5	0.925	88.2
30	0.0681	69.6	0.805	76.7
45	0.0590	60.3	0.670	63.9
60	0.0473	48.3	0.536	51.1

[1] sofort nach Lösen des Thiols im Inkubationsmedium (0°C) gemessene Konzentration

Inkubationsmedium (KRB-Lsg. + 2% RSA, pH 7.35) mit der entsprechenden Ausgangskonzentration (0.1 mM, 1.0 mM) von N-Acetyl-L-cystein wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt (≙ 0 min) und anschließend mit Carbogen begast. Nach den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und über die Bestimmung der freien SH-Gruppe (ELLMAN, 1959) die Konzentration von N-Acetyl-L-cystein ermittelt.

Ergebnisse beruhen auf Mittelwerten aus drei Versuchen.

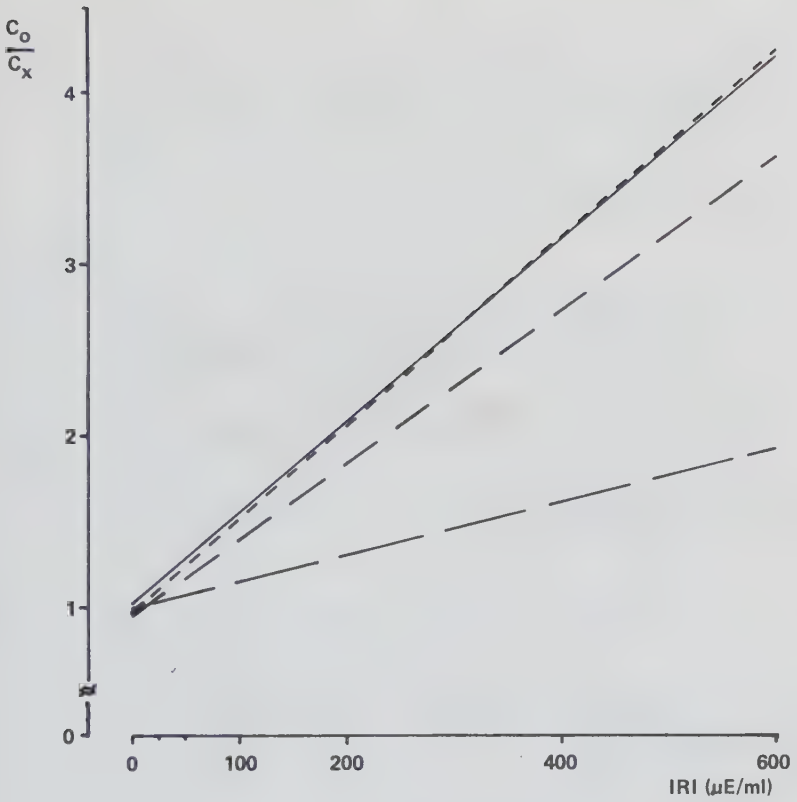


Abb. 4.5: Einfluß von N-Acetyl-L-cystein auf den Verlauf der Eichkurven des Insulin-Radioimmunoassays.

——————— Kontrolle (r = 0.987)

- - - - - - - - - - - N-Acetyl-L-cystein 0.1 mM (r = 0.999)

——— ——— N-Acetyl-L-cystein 0.5 mM (r = 0.998)

——————— N-Acetyl-L-cystein 1.0 mM (r = 0.994)

C_o = Bezugswert (Radioaktivität des an den Antikörper gebundenen ^{125}I-Insulins in Abwesenheit (o) von Ratteninsulin)

C_x = Meßwert (Radioaktivität des an den Antikörper gebundenen ^{125}I-Insulins in Anwesenheit (x) von Ratteninsulin)

4.2.3 Einfluß von N-Acetyl-L-cystein auf die Insulinsekretion bei stimulatorischer (11.1 mM) und substimulatorischer (2.8 mM) Glucosekonzentration

Aus den Dosis-Wirkungs-Kurven, dargestellt in Abb. 4.6, und aus Tab. 4.4 ist zu erkennen, daß

a) N-Acetyl-L-cystein zu einer signifikanten ($p < 0.005$) Steigerung der Glucose-induzierten Insulinsekretion (I.) im Konzentrationsbereich von 0.05 - 0.50 mM führt. Obwohl höhere Konzentrationen von N-Acetyl-L-cystein nicht mehr getestet werden konnten (s. 4.2.2) kann aufgrund des nur sehr geringen Ansteigens der potenzierenden Wirkung im Bereich von 0.05 - 0.5 mM davon ausgegangen werden, daß das Wirkungsmaximum bei 0.5 mM bereits erreicht ist.

b) es bei substimulatorischer Glucosekonzentration (II.) zu keiner stimulierenden Wirkung des Thiols kommt. Die ermittelten Insulinkonzentrationen liegen entweder auf gleichem Niveau oder sogar unterhalb des Kontrollwertes.

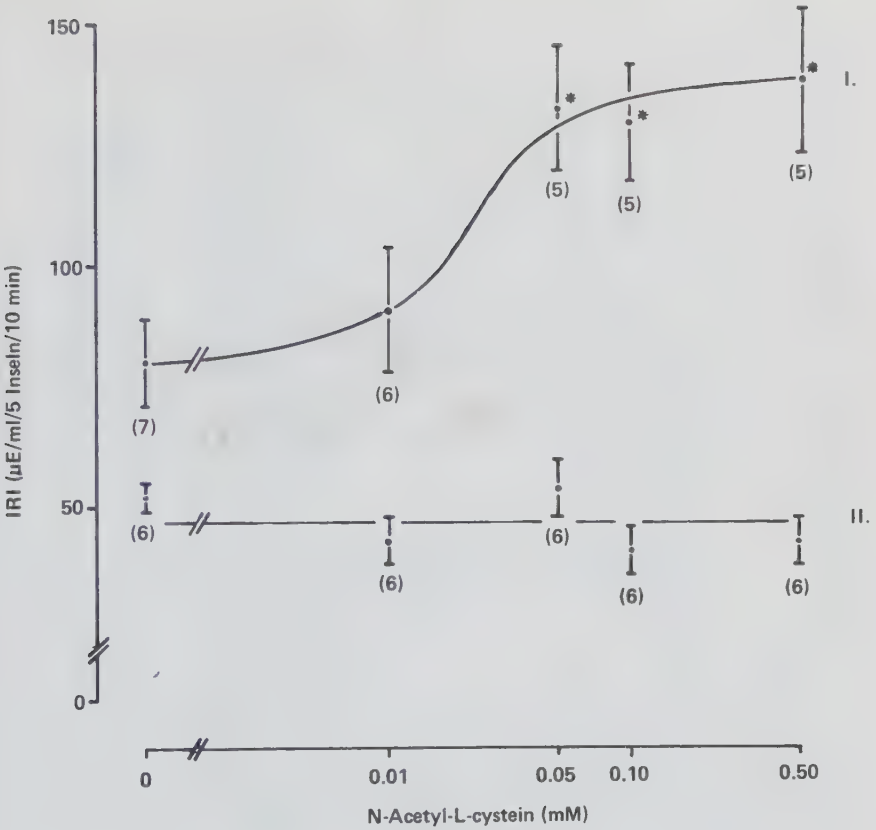


Abb. 4.6: Einfluß von N-Acetyl-L-cystein auf die Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte: I. Bei stimulatorischer Glucosekonzentration (11.1 mM); II. Bei substimulatorischer Glucosekonzentration (2.8 mM).

Gruppen von je 5 Inseln pro Netzgefäß wurden 30 Min. in 1.0 ml KRB-Lösung (+ 2% RSA) mit Glucose (2.8 bzw. 11.1 mM) bei 37°C im Wasserbad unter Carbogenbegasung inkubiert, anschliessend das Medium gewechselt und unter Einfluß der dargestellten Konzentrationen von N-Acetyl-L-cystein bei sonst gleichbleibenden Bedingungen 10 Min. weiterinkubiert.

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mittelwerte ± SEM

t-Test: $*p < 0.005$

Tab. 4.4: Einfluß von N-Acetyl-L-cystein auf die Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte: I. bei stimulatorischer Glucosekonzentration (11.1 mM); II. bei substimulatorischer Glucosekonzentration (2.8 mM).

	Insulin (µE IRI/ml/5 Inseln/10 min)				
		N-Acetyl-L-cystein (mM)			
		0.01	0.05	0.10	0.50
I. Glucose 11.1 mM	79.7 ± 9.4 (7) A	91.0 ± 13.3 (6) B	133.3 ± 13.3 (6) C	130.4 ± 12.2 (5) D	138.2 ± 15.0 (5) E
II. Glucose 2.8 mM	51.5 ± 2.9 (6) F	42.8 ± 4.9 (6) G	54.3 ± 6.3 (6) H	40.5 ± 4.7 (6) I	42.5 ± 5.4 (6) J

Gruppen von je 5 Inseln pro Netzgefäß wurden 30 Min. in 1.0 ml KRB-Lsg. (+ 2% RSA) mit Glucose (2.8 bzw. 11.1 mM) bei 37°C im Wasserbad unter Carbogenbegasung inkubiert, anschließend das Medium gewechselt und unter Einfluß der dargestellten Konzentrationen von N-Acetyl-L-cystein bei sonst gleichbleibenden Bedingungen 10 Min. weiterinkubiert.

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mittelwerte ± SEM

t-Test: AB n.s.; AC, AD, AE $p < 0.005$; FG, FH, FI, FJ n.s.

4.3 L-Cystein-methylester

4.3.1 Konzentrationsänderungen im Inkubationsmedium

Betrachtet man die in Abb. 4.7 und Tab. 4.5 dargestellten Ergebnisse, so fällt sofort der Unterschied in der prozentualen Abnahme zwischen den beiden getesteten Konzentrationen (0.1; 1.0 mM) auf. Schon nach 30 Min. ist bei einer Ausgangskonzentration von 0.1 mM kein L-Cystein-methylester mehr bestimmbar, während von 1.0 mM noch 57.7% vorhanden sind.
Nach einer Inkubationszeit von 10 Min. verfügt man noch über 44.8% (bei 0.1 mM) bzw. 85.4% (bei 1.0 mM) der Ausgangskonzentration.

4.3.2 Einfluß auf den Verlauf der Eichgeraden des Insulin-Radioimmunoassays

Aus den Eichgeraden, dargestellt in Abb. 4.8, kann folgendes entnommen werden:
Auch bei dieser Substanz ist eine Beeinflussung der Eichgeraden in einem Konzentrationsbereich $\leq$ 0.1 mM nicht festzustellen.
Höhere Konzentrationen (0.5; 1.0 mM) führen zu einer dosisabhängigen Verminderung der Eichgeradensteigung, was einer Abnahme des radioimmunologisch meßbaren Insulins der Eichproben auf 85.4% (0.5 mM) bzw. 76.8% (1.0 mM) entspricht. Bei Verwendung von 5.0 mM sind nur bei den beiden höchsten Eich-Konzentrationen (400, 600 µE) Reste von Insulin nachweisbar; die Erstellung einer Eichgeraden ist deshalb nicht mehr möglich.
Als höchste Konzentration zur Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve wurde 1.0 mM L-Cystein-methylester verwendet.

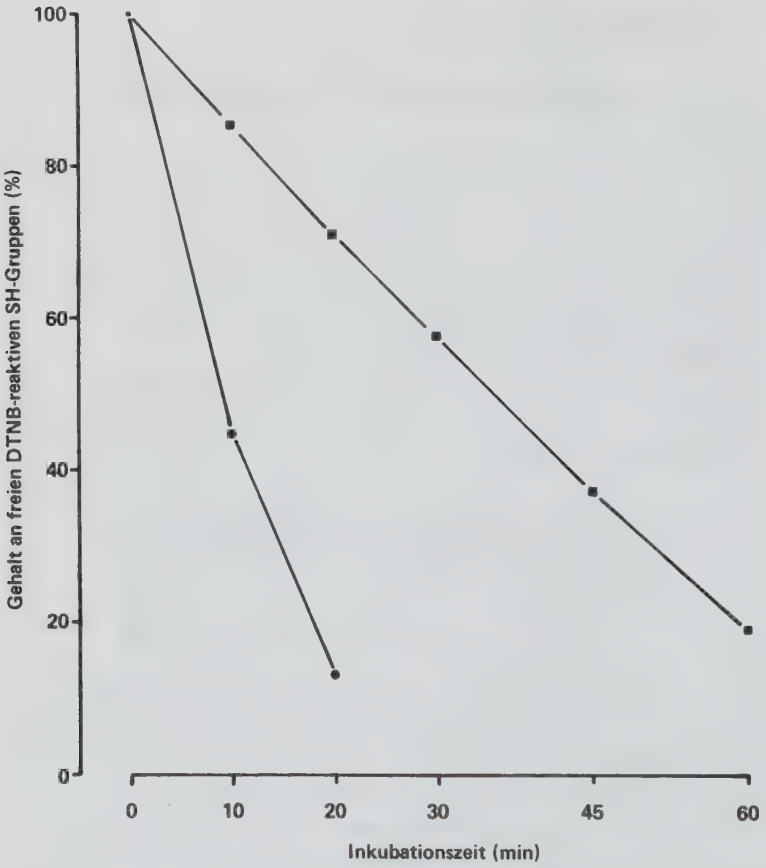


Abb. 4.7: Konzentrationsänderungen von L-Cystein-methylester im Inkubationsmedium in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Inkubationsmedium (KRB-Lsg. + 2% RSA, pH 7,35) mit der entsprechenden Ausgangskonzentration von L-Cystein-methylester (●——● 0.1 mM; ■——■ 1.0 mM) wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt (≙ 0 min) und anschließend mit Carbogen begast. Nach 0, 10, 20, 30, 45 und 60 Min. wurden Proben entnommen und über die Bestimmung der freien SH-Gruppe (ELLMAN, 1959) die Konzentration von L-Cystein-methylester ermittelt.

Angabe in % der Ausgangskonzentration (0 min)

Dargestellte Ergebnisse beruhen auf Mittelwerten aus drei Versuchen.

Tab. 4.5: Konzentrationsänderungen von L-Cystein-methylester im Inkubationsmedium in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

	L-Cystein-methylester			
	0.1 mM		1.0 mM	
Kontrolle[1] (mM)	0.1145		0.988	
Zeit (min)	mM	%	mM	%
0	0.0946	100.0	0.959	100.0
10	0.0424	44.8	0.819	85.4
20	0.0124	13.1	0.682	71.1
30	0.0001	0.1	0.553	57.7
45	—	–	0.356	37.1
60	—	–	0.180	18.8

[1] sofort nach Lösen des Thiols im Inkubationsmedium (0°C) gemessene Konzentration

Inkubationsmedium (KRB-Lsg. + 2% RSA, pH 7.35) mit der entsprechenden Ausgangskonzentration (0.1 mM, 1.0 mM) von L-Cystein-methylester wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt (≙ 0 min) und anschließend mit Carbogen begast. Nach den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und über die Bestimmung der freien SH-Gruppe (ELLMAN, 1959) die Konzentration von L-Cystein-methylester ermittelt.

Ergebnisse beruhen auf Mittelwerten aus drei Versuchen.

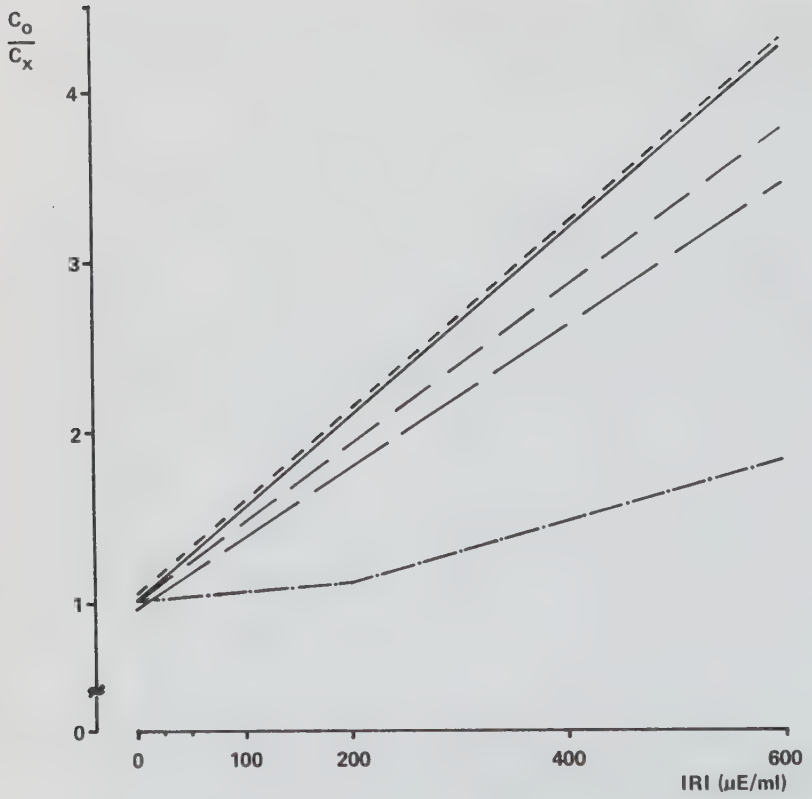


Abb. 4.8: Einfluß von L-Cystein-methylester auf den Verlauf der Eichkurven des Insulin-Radioimmunoassays.

——————— Kontrolle (r = 0.987)

– – – – – – – – – – L-Cystein-methylester 0.1 mM (r = 0.988)

—— —— —— L-Cystein-methylester 0.5 mM (r = 0.998)

——— ——— L-Cystein-methylester 1.0 mM (r = 0.998)

—·—·—·—·— L-Cystein-methylester 5.0 mM

C_o = Bezugswert (Radioaktivität des an den Antikörper gebundenen ^{125}I-Insulins in Abwesenheit (o) von Ratteninsulin)

C_x = Meßwert (Radioaktivität des an den Antikörper gebundenen ^{125}I-Insulins in Anwesenheit (x) von Ratteninsulin)

4.3.3 Einfluß von L-Cystein-methylester auf die Insulinsekretion bei stimulatorischer (11.1 mM) und substimulatorischer (2.8 mM) Glucosekonzentration

Die Dosis-Wirkungs-Kurven, dargestellt in Abb. 4.9, und die dazugehörigen Werte (Tab. 4.6) lassen folgende Aussagen zu:

a) L-Cystein-methylester führt bei zwei Konzentrationen (0.5 u. 1.0 mM) zu einer signifikanten Steigerung der durch 11.1 mM Glucose (I.) induzierten Sekretion von Insulin. Da höhere Konzentrationen unter den hier gewählten Bedingungen nicht untersucht werden konnten (s. 4.3.2), war es nicht möglich, die Dosis-Wirkungs-Kurve komplett zu erstellen. Über die Lage des Wirkungsmaximums kann deshalb auch keine konkrete Aussage gemacht werden.

b) Eine Eigenwirkung von L-Cystein-methylester wurde nicht beobachtet. Die bei substimulatorischer Glucosekonzentration (II.) unter Einfluß des Thiols ermittelten Insulinkonzentrationen liegen alle im Bereich des Kontrollwertes.

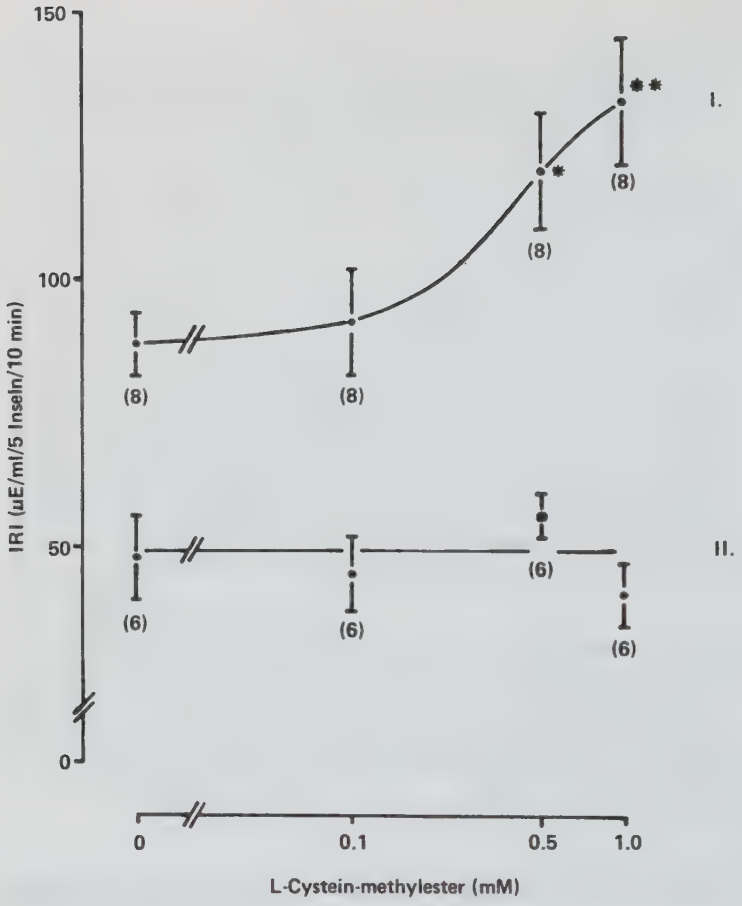


Abb. 4.9: Einfluß von L-Cystein-methylester auf die Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte: I. Bei stimulatorischer Glucosekonzentration (11.1 mM); II. Bei substimulatorischer Glucosekonzentration (2.8 mM).

Gruppen von je 5 Inseln pro Netzgefäß wurden 30 Min. in 1.0 ml KRB-Lösung (+ 2% RSA) mit Glucose (2.8 bzw. 11.1 mM) bei 37°C im Wasserbad unter Carbogenbegasung inkubiert, anschließend das Medium gewechselt und unter Einfluß der dargestellten Konzentrationen von L-Cystein-methylester bei sonst gleichbleibenden Bedingungen 10 Min. weiterinkubiert.

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mittelwerte ± SEM

t-Test: $*p < 0.05$
$**p < 0.005$

Tab. 4.6: Einfluß von L-Cystein-methylester auf die Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte: I. bei stimulatorischer Glucosekonzentration (11.1 mM); II. bei substimulatorischer Glucosekonzentration (2.8 mM).

	Insulin (µE IRI/ml/5 Inseln/10 min)			
		L-Cystein-methylester (mM)		
		0.10	0.50	1.00
I. Glucose 11.1 mM	88.1 ± 5.6 (8) A	91.8 ± 10.1 (8) B	119.8 ± 11.2 (8) C	132.8 ± 12.0 (8) D
II. Glucose 2.8 mM	48.0 ± 7.7 (6) E	45.0 ± 7.1 (6) F	56.0 ± 4.4 (6) G	41.3 ± 5.8 (6) H

Gruppen von je 5 Inseln pro Netzgefäß wurden 30 Min. in 1.0 ml KRB-Lsg. (+ 2% RSA) mit Glucose (2.8 bzw. 11.1 mM) bei 37°C im Wasserbad unter Carbogenbegasung inkubiert, anschließend das Medium gewechselt und unter Einfluß der dargestellten Konzentrationen von L-Cystein-methylester bei sonst gleichbleibenden Bedingungen 10 Min. weiterinkubiert.

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mittelwerte ± SEM

t-Test: AB n.s. EF
AC $p < 0.05$ EG } n.s.
AD $p < 0.005$ EH

4.4 L-Cystein-ethylester

4.4.1 Konzentrationsänderungen im Inkubationsmedium

Die in Abb. 4.10 u. Tab. 4.7 veranschaulichten Ergebnisse sind mit den von L-Cystein-methylester (4.3.1) erhaltenen Werten nahezu identisch. Die Inaktivierung der SH-Gruppe des L-Cystein-ethylesters verläuft minimal langsamer ab, was auf eine geringfügig verbesserte Stabilität der SH-Gruppe hinweist.
Die verbliebenen prozentualen Anteile der Ausgangskonzentration nach 10-minütiger Inkubation betragen: 44.9% bei 0.1 mM; 89.8% bei 1.0 mM.

4.4.2 Einfluß auf den Verlauf der Eichgeraden des Insulin-Radioimmunoassays

Die in Abb. 4.11 dargestellten Eichgeraden lassen im Vergleich zu L-Cystein-methylester (s. 4.3.2) identische Schlußfolgerungen zu:
Die Eichgerade wird in einem Konzentrationsbereich $\leq$ 0.1mM nicht beeinflußt.
Höhere Konzentrationen (0.5; 1.0 mM) führen ebenfalls zu einer dosisabhängigen Verminderung der Eichgeraden-Steigung, was einer Abnahme des radioimmunologisch meßbaren Insulins der Eichproben auf 81.7% (0.5 mM) bzw. 75.1% (1.0 mM) entspricht.
Auch bei Verwendung von 5.0 mM L-Cystein-ethylester ist die Erstellung einer Eichgeraden nicht mehr möglich.
Zur Untersuchung des Einfluß von L-Cystein-ethylester (s. 4.4.3) auf die Insulinsekretion wurden deshalb nur Konzentrationen bis einschließlich 1.0 mM verwendet.

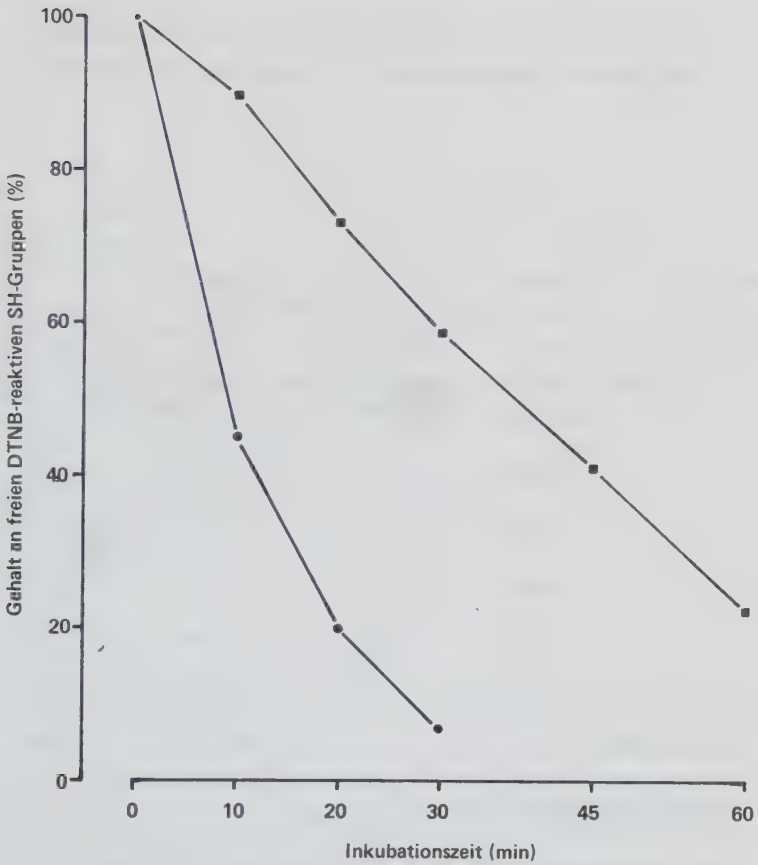


Abb. 4.10: Konzentrationsänderungen von L-Cystein-ethylester im Inkubationsmedium in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Inkubationsmedium (KRB-Lsg. + 2% RSA, pH 7,35) mit der entsprechenden Ausgangskonzentration von L-Cystein-ethylester (●——● 0.1 mM; ■——■ 1.0 mM) wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt (≙ 0 min) und anschließend mit Carbogen begast. Nach 0, 10, 20, 30, 45 und 60 Min. wurden Proben entnommen und über die Bestimmung der freien SH-Gruppe (ELLMAN, 1959) die Konzentration von L-Cystein-ethylester ermittelt.

Angabe in % der Ausgangskonzentration (0 min)

Dargestellte Ergebnisse beruhen auf Mittelwerten aus drei Versuchen.

Tab. 4.7: Konzentrationsänderungen von L-Cystein-ethylester im Inkubationsmedium in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

	L-Cystein-ethylester			
	0.1 mM		1.0 mM	
Kontrolle[1] (mM)	0.1063		0.987	
Zeit (min)	mM	%	mM	%
0	0.0908	100.0	0.960	100.0
10	0.0408	44.9	0.862	89.8
20	0.0180	19.8	0.703	73.2
30	0.0062	6.8	0.565	58.9
45	—	–	0.396	41.3
60	—	–	0.216	22.5

[1] sofort nach Lösen des Thiols im Inkubationsmedium (0°C) gemessene Konzentration

Inkubationsmedium (KRB-Lsg. + 2% RSA, pH 7.35) mit der entsprechenden Ausgangskonzentration (0.1 mM, 1.0 mM) von L-Cystein-ethylester wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt (≙ 0 min) und anschließend mit Carbogen begast. Nach den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und über die Bestimmung der freien SH-Gruppe (ELLMAN, 1959) die Konzentration von L-Cystein-ethylester ermittelt.

Ergebnisse beruhen auf Mittelwerten aus drei Versuchen.

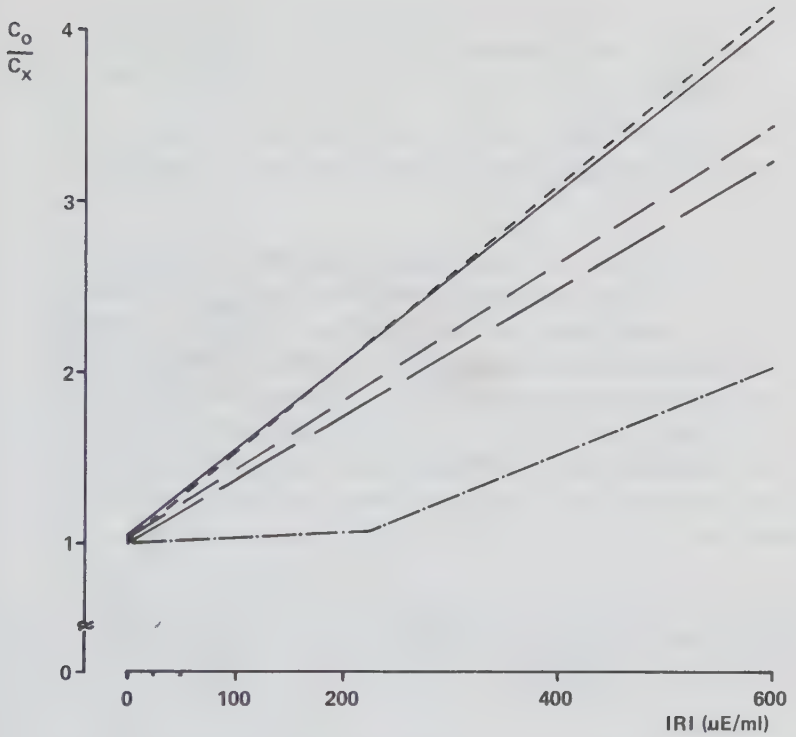


Abb. 4.11: Einfluß von L-Cystein-ethylester auf den Verlauf der Eichkurven des Insulin-Radioimmunoassays.

——————— Kontrolle (r = 0.993)

– – – – – – – – – – L-Cystein-ethylester 0.1 mM (r = 0.992)

—— —— —— L-Cystein-ethylester 0.5 mM (r = 0.997)

——— ——— L-Cystein-ethylester 1.0 mM (r = 0.995)

·—·—·—·—· L-Cystein-ethylester 5.0 mM

C_o = Bezugswert (Radioaktivität des an den Antikörper gebundenen ^{125}I-Insulins in Abwesenheit (o) von Ratteninsulin)

C_x = Meßwert (Radioaktivität des an den Antikörper gebundenen ^{125}I-Insulins in Anwesenheit (x) von Ratteninsulin)

4.4.3 Einfluß von L-Cystein-ethylester auf die Insulinsekretion bei stimulatorischer (11.1 mM) und substimulatorischer (2.8 mM) Glucosekonzentration

Aus den Dosis-Wirkungs-Kurven, dargestellt in Abb. 4.12 und den dazugehörigen Werten (Tab. 4.8) ist ersichtlich, daß

a) L-Cystein-ethylester (ebenso wie der Methylester, vgl. 4.3.3) bei zwei Konzentrationen (0.5 u. 1.0 mM) zu einer signifikanten Steigerung der durch 11.1 mM Glucose induzierten Sekretion von Insulin führt (I.). Die Untersuchung von höheren Konzentrationen war nicht durchführbar (s. 4.4.2); die Erstellung einer vollständigen Dosis-Wirkungs-Kurve und eine Aussage über die Lage des Wirkungsmaximums war deshalb nicht möglich.

b) bei substimulatorischer Glucosekonzentration eine Steigerung ebenfalls ausbleibt; eine Eigenwirkung also nicht vorhanden ist (II.).

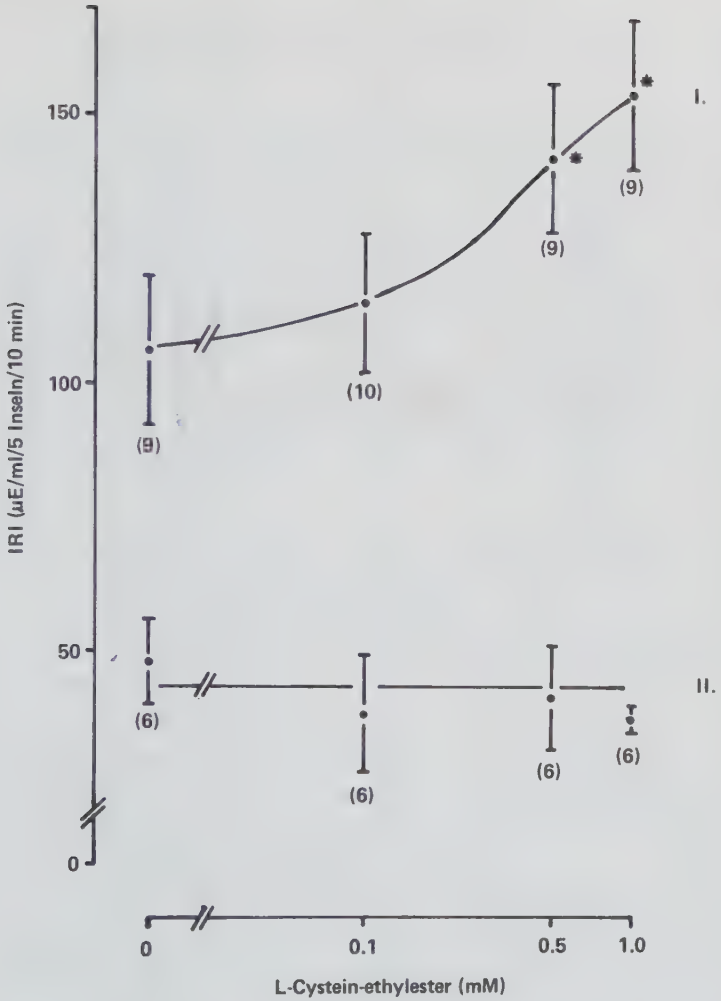


Abb. 4.12: Einfluß von L-Cystein-ethylester auf die Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte: I. Bei stimulatorischer Glucosekonzentration (11.1 mM); II. Bei substimulatorischer Glucosekonzentration (2.8 mM).

Gruppen von je 5 Inseln pro Netzgefäß wurden 30 Min. in 1.0 ml KRB-Lösung (+ 2% RSA) mit Glucose (2.8 bzw. 11.1 mM) bei 37°C im Wasserbad unter Carbogenbegasung inkubiert, anschließend das Medium gewechselt und unter Einfluß der dargestellten Konzentrationen von L-Cystein-ethylester bei sonst gleichbleibenden Bedingungen 10 Min. weiterinkubiert.

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mittelwerte ± SEM

t-Test: *$p < 0.05$

Tab. 4.8: Einfluß von L-Cystein-ethylester auf die Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte: I. bei stimulatorischer Glucosekonzentration (11.1 mM); II. bei substimulatorischer Glucosekonzentration (2.8 mM).

	Insulin (µE IRI/ml/5 Inseln/10 min)			
		L-Cystein-ethylester (mM)		
		0.10	0.50	1.00
I. Glucose 11.1 mM	106.3 ± 14.4 (9) A	115.2 ± 12.9 (10) B	141.9 ± 14.3 (9) C	154.3 ± 13.7 (9) D
II. Glucose 2.8 mM	48.0 ± 7.7 (6) E	37.7 ± 10.7 (6) F	40.7 ± 9.5 (6) G	37.3 ± 1.6 (6) H

Gruppen von je 5 Inseln pro Netzgefäß wurden 30 Min. in 1.0 ml KRB-Lsg. (+ 2% RSA) mit Glucose (2.8 bzw. 11.1 mM) bei 37°C im Wasserbad unter Carbogenbegasung inkubiert, anschließend das Medium gewechselt und unter Einfluß der dargestellten Konzentrationen von L-Cystein-ethylester bei sonst gleichbleibenden Bedingungen 10 Min. weiterinkubiert.

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mittelwerte ± SEM

t-Test: AB n.s.; AC, AD $p < 0.05$; EF, EG, EH n.s.

4.5 Natrium-2-mercaptoethansulfonat (Mesna)

4.5.1 Konzentrationsänderungen im Inkubationsmedium

Wie aus Abb. 4.13 u. Tab. 4.9 zu erkennen ist, kommt es bei beiden untersuchten Ausgangskonzentrationen zu einer linearen Abnahme der freien SH-Gruppe, bei 0.1 mM wesentlich schneller (nach 60 Min. noch 21.7% der Ausgangskonz.) als bei 1.0 mM (nach 60 Min. noch 59.2% der Ausgangskonz.).
Nach einer Inkubationszeit von 10 Min. kann noch über 82.4% (bei 0.1 mM) und 94.9% (bei 1.0 mM) der Ausgangskonzentration verfügt werden.

4.5.2 Einfluß auf den Verlauf der Eichgeraden des Insulin-Radioimmunoassays

Auch bei Mesna (Abb. 4.14) ist eine Beeinflussung der Eichgeraden in einem Konzentrationsbereich $\leq$0.1 mM nicht zu erkennen.
Eine Konzentration von 0.5 mM führt bereits zu einer sichtbaren Abflachung der Eichgeraden, was einer Abnahme des radioimmunologisch bestimmbaren Insulins der Eichproben von 87.3% entspricht.
Bei Verwendung von 1.0 mM wird nur noch 33% des für die Eichgerade eingesetzten Insulins gefunden.
Für die Dosis-Wirkungs-Kurve wurden deshalb nur Konzentrationen bis 0.5 mM untersucht.

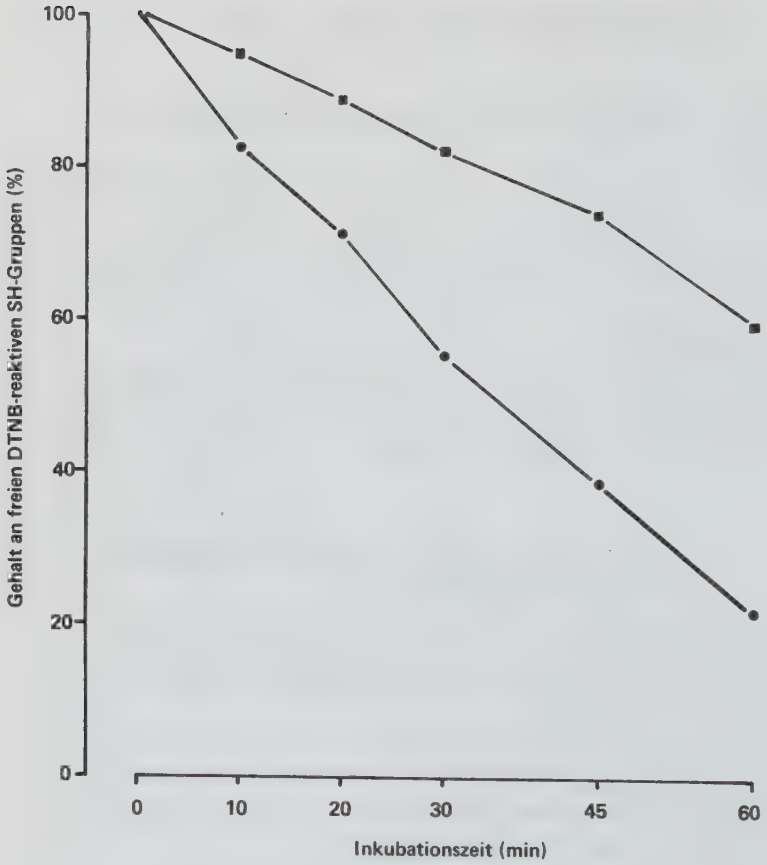


Abb. 4.13: Konzentrationsänderungen von Natrium-2-mercaptoethansulfonat (Mesna) im Inkubationsmedium in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Inkubationsmedium (KRB-Lsg. + 2% RSA), pH 7,35) mit der entsprechenden Ausgangskonzentration von Mesna (●——● 0.1 mM; ■——■ 1.0 mM) wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt (≙ 0 min) und anschließend mit Carbogen begast. Nach 0, 10, 20, 30, 45 und 60 Min. wurden Proben entnommen und über die Bestimmung der freien SH-Gruppe (ELLMAN, 1959) die Konzentration von Mesna ermittelt.

Angabe in % der Ausgangskonzentration (0 min)

Dargestellte Ergebnisse beruhen auf Mittelwerten aus drei Versuchen.

Tab. 4.9: Konzentrationsänderungen von Natrium-2-mercaptoethansulfonat (Mesna) im Inkubationsmedium in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

	Natrium-2-mercaptoethansulfonat			
	0.1 mM		1.0 mM	
Kontrolle[1] (mM)	0.0957		0.989	
Zeit (min)	mM	%	mM	%
0	0.0933	100.0	0.978	100.0
10	0.0769	82.4	0.928	94.9
20	0.0663	71.1	0.867	88.7
30	0.0514	55.1	0.801	81.9
45	0.0359	38.5	0.720	73.6
60	0.0202	21.7	0.579	59.2

[1] sofort nach Lösen des Thiols im Inkubationsmedium (0°C) gemessene Konzentration

Inkubationsmedium (KRB-Lsg. + 2% RSA, pH 7.35) mit der entsprechenden Ausgangskonzentration (0.1 mM, 1.0 mM) von Mesna wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt (≙ 0 min) und anschließend mit Carbogen begast. Nach den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und über die Bestimmung der freien SH-Gruppe (ELLMAN, 1959) die Konzentration von Mesna ermittelt.

Ergebnisse beruhen auf Mittelwerten aus drei Versuchen.

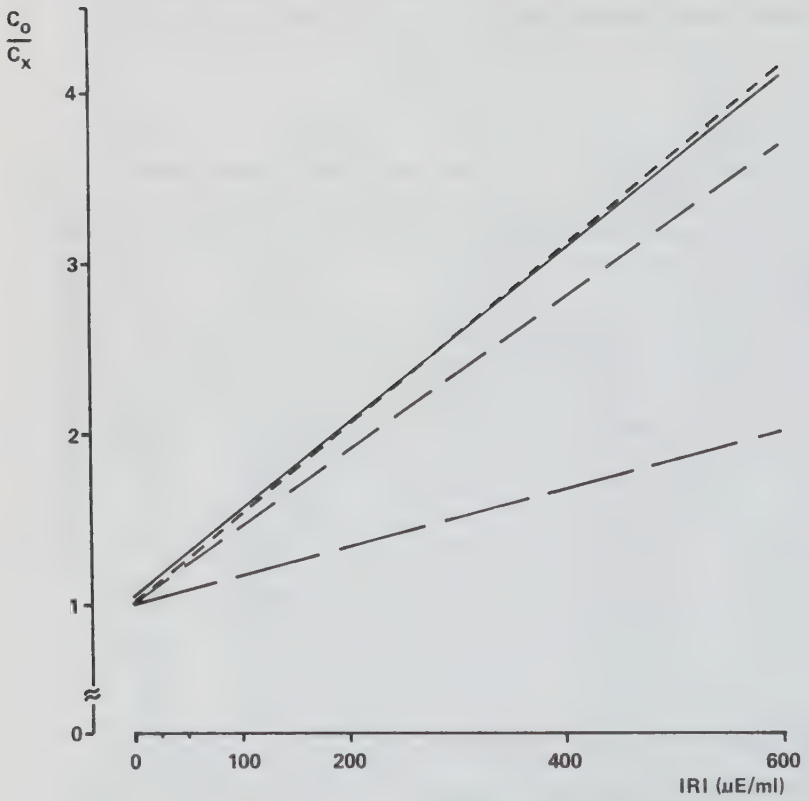


Abb. 4.14: Einfluß von Natrium-2-mercaptoethansulfonat (Mesna) auf den Verlauf der Eichkurven des Insulin-Radioimmunoassays.

——————— Kontrolle (r = 0.993)

- - - - - - - - - - - Mesna 0.1 mM (r = 0.997)

—— —— —— Mesna 0.5 mM (r = 0.996)

——— ——— Mesna 1.0 mM (r = 0.996)

C_o = Bezugswert (Radioaktivität des an den Antikörper gebundenen ^{125}I-Insulins in Abwesenheit (o) von Ratteninsulin)

C_x = Meßwert (Radioaktivität des an den Antikörper gebundenen ^{125}I-Insulins in Anwesenheit (x) von Ratteninsulin)

4.5.3 Einfluß von Mesna auf die Insulinsekretion bei stimulatorischer (11.1 mM) und substimulatorischer (2.8 mM) Glucosekonzentration

Die Ergebnisse, dargestellt in Abb. 4.15 u. Tab. 4.10, zeigen keinen signifikanten Einfluß von Mesna auf die Insulinsekretion, weder bei stimulatorischer (I.) noch bei substimulatorischer (II.) Glucosekonzentration. Die gemessenen Insulinkonzentrationen liegen jeweils im Bereich der Kontrollwerte.

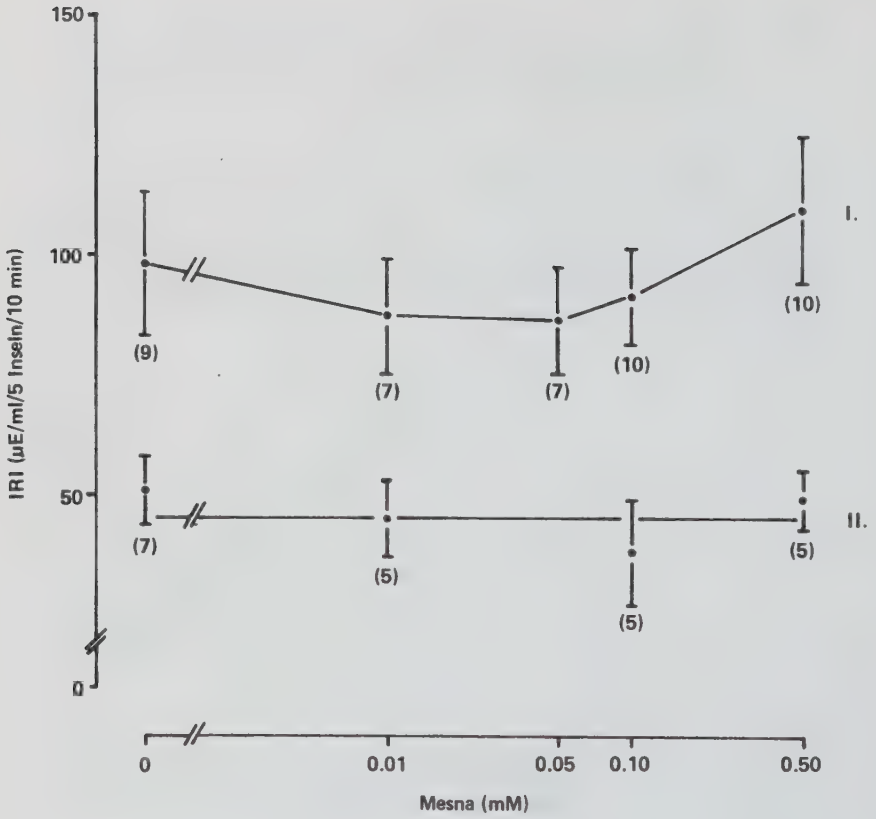


Abb. 4.15: Einfluß von Natrium-2-mercaptoethansulfonat (Mesna) auf die Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte: I. Bei stimulatorischer Glucosekonzentration (11.1 mM); II. Bei substimulatorischer Glucosekonzentration (2.8 mM).

Gruppen von je 5 Inseln pro Netzgefäß wurden 30 Min. in 1.0 ml KRB-Lösung (+ 2% RSA) mit Glucose (2.8 bzw. 11.1 mM) bei 37°C im Wasserbad unter Carbogenbegasung inkubiert, anschließend das Medium gewechselt und unter Einfluß der dargestellten Konzentrationen von Mesna bei sonst gleichbleibenden Bedingungen 10 Min. weiterinkubiert.

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mittelwerte ± SEM

Tab. 4.10: Einfluß von Natrium-2-mercaptoethansulfonat (Mesna) auf die Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte: I. bei stimulatorischer Glucosekonzentration (11.1 mM); II. bei substimulatorischer Glucosekonzentration (2.8 mM)

	Insulin (µE IRI/ml/5 Inseln/10 min)				
		Mesna (mM)			
		0.01	0.05	0.10	0.50
I. Glucose 11.1 mM	98.0 ± 14.9 (9) A	87.1 ± 12.4 (7) B	85.6 ± 11.0 (7) C	91.1 ± 10.3 (10) D	108.5 ± 15.2 (10) E
II. Glucose 2.8 mM	50.6 ± 7.3 (7) F	44.8 ± 8.4 (5) G	———	37.6 ± 11.1 (5) H	49.0 ± 5.6 (5) I

Gruppen von je 5 Inseln pro Netzgefäß wurden 30 Min. in 1.0 ml KRB-Lsg. (+ 2% RSA) mit Glucose (2.8 bzw. 11.1 mM) bei 37°C im Wasserbad unter Carbogenbegasung inkubiert, anschließend das Medium gewechselt und unter Einfluß der dargestellten Mesna-Konzentrationen bei sonst gleichbleibenden Bedingungen 10 Min. weiterinkubiert.

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mittelwerte ± SEM

t-Test: AB, AC, AD, AE } n.s. FG, FH, FI } n.s.

4.6 2-Mercaptopropionylglycin (Tiopronin)

4.6.1 Konzentrationsänderungen im Inkubationsmedium

Die in Abb. 4.16 und Tab. 4.11 dargestellten Ergebnisse zeigen den unterschiedlichen Verlauf der Inaktivierung der SH-Gruppe bei zwei verschiedenen Ausgangskonzentrationen von Tiopronin (0.1 u. 1.0 mM).
Nach der gesamten Inkubationszeit (60 Min.) verfügt man noch über 35.5% (bei 0.1 mM) bzw. 41.5% (bei 1.0 mM) der Ausgangskonzentration.
Bei 0.1 mM erkennt man in den ersten 10 Min. der Inkubation einen starken Konzentrationsabfall (auf 75.3% der Ausgangskonz.), der dann nach und nach geringer wird. Bei 1.0 mM ist der Konzentrationsabfall in den ersten 10 Min. wesentlich geringer (auf 92.8% der Ausgangskonz.), wird dann allerdings etwas größer (bis zu 14.6%/10 min).

4.6.2 Einfluß auf den Verlauf der Eichgeraden des Insulin-Radioimmunoassays

Der identische Verlauf der Eichgeraden ohne und mit 0.1 mM Tiopronin, dargestellt in Abb. 4.17, zeigt, daß auch Tiopronin in einem Konzentrationsbereich $\leq$ 0.1 mM nicht zur Beeinflussung der Eichgeraden führt.
Dagegen zeigt bereits 0.5 mM eine deutliche Verringerung der Eichgeraden-Steigung, was einer Abnahme des radioimmunologisch meßbaren Insulingehaltes der Eichproben auf 70.4% entspricht. Bei einer Verdoppelung der Konzentration auf 1.0 mM findet man nur noch 20.7% der eingesetzten Eich-Konzentrationen.
Der Einfluß von Tiopronin auf die Insulinsekretion konnte deshalb nur bis zu einer Konzentration von 0.5 mM untersucht werden.

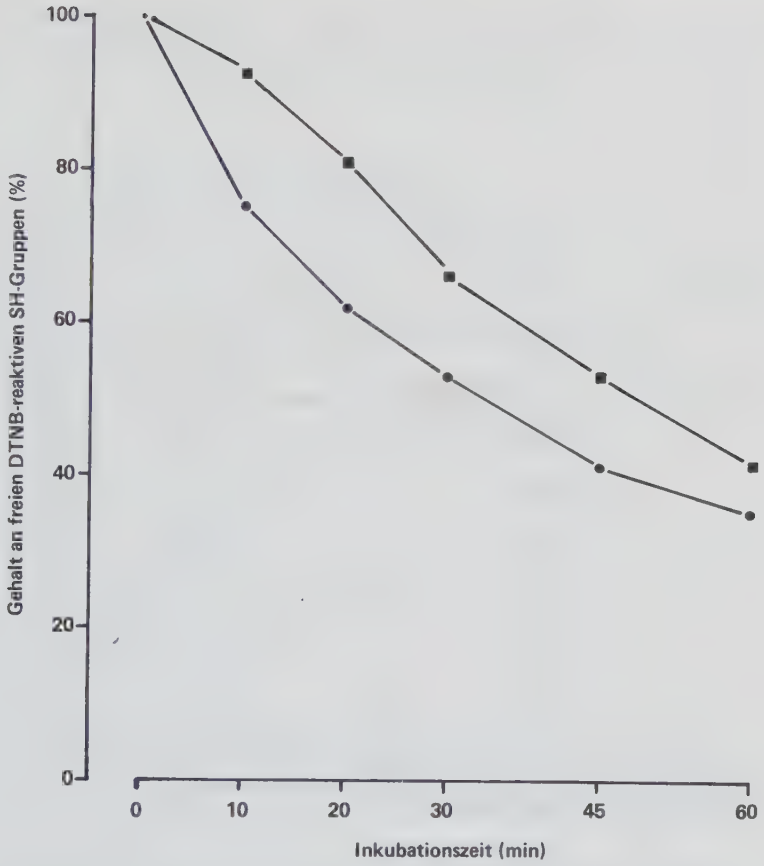


Abb. 4.16: Konzentrationsänderungen von 2-Mercaptopropionylglycin (Tiopronin) im Inkubationsmedium in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Inkubationsmedium (KRB-Lsg. + 2% RSA, pH 7,35) mit der entsprechenden Ausgangskonzentration von Tiopronin (●——● 0.1 mM; ■——■ 1.0 mM) wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt (≙ 0 min) und anschließend mit Carbogen begast. Nach 0, 10, 20, 30, 45 und 60 Min. wurden Proben entnommen und über die Bestimmung der freien SH-Gruppe (ELLMAN, 1959) die Konzentration von Tiopronin ermittelt.

Angabe in % der Ausgangskonzentration (0 min)

Dargestellte Ergebnisse beruhen auf Mittelwerten aus drei Versuchen.

Tab. 4.11: Konzentrationsänderungen von 2-Mercaptopropionylglycin (Tiopronin) im Inkubationsmedium in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

	2-Mercaptopropionylglycin			
	0.1 mM		1.0 mM	
Kontrolle[1] (mM)	0.0935		0.965	
Zeit (min)	mM	%	mM	%
0	0.0894	100.0	0.943	100.0
10	0.0673	75.3	0.875	92.8
20	0.0555	62.1	0.765	81.1
30	0.0477	53.4	0.627	66.5
45	0.0372	41.6	0.503	53.3
60	0.0317	35.5	0.391	41.5

[1] sofort nach Lösen des Thiols im Inkubationsmedium (0°C) gemessene Konzentration

Inkubationsmedium (KRB-Lsg. + 2% RSA, pH 7.35) mit der entsprechenden Ausgangskonzentration (0.1 mM, 1.0 mM) von Tiopronin wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt (≙ 0 min) und anschließend mit Carbogen begast. Nach den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und über die Bestimmung der freien SH-Gruppe (ELLMAN, 1959) die Konzentration von Tiopronin ermittelt.

Ergebnisse beruhen auf Mittelwerten aus drei Versuchen.

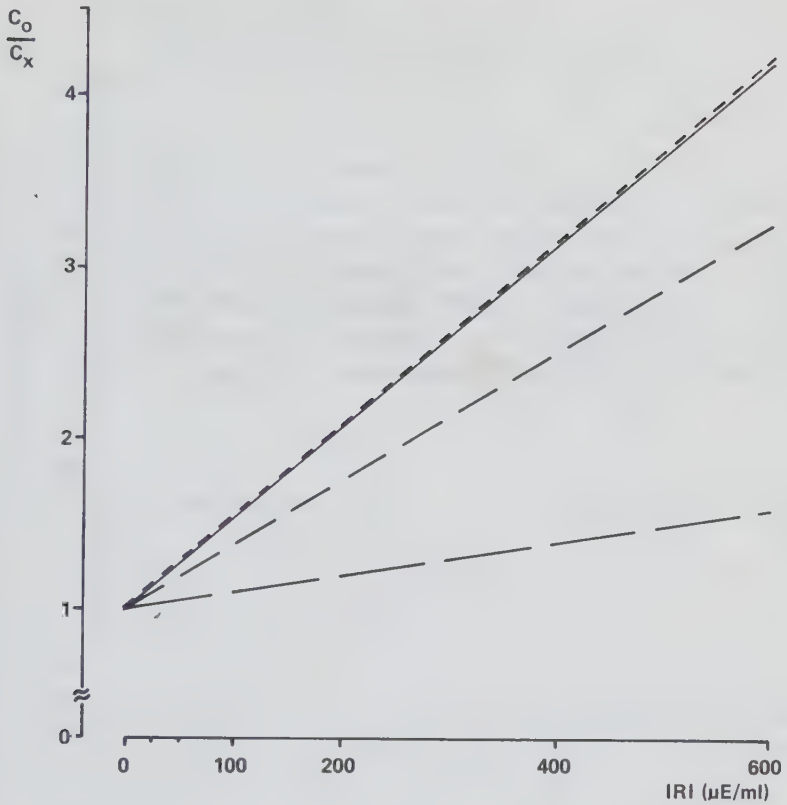


Abb. 4.17: Einfluß von 2-Mercaptopropionylglycin (Tiopronin) auf den Verlauf der Eichkurven des Insulin-Radioimmunoassays.

——————— Kontrolle (r = 0.987)

– – – – – – – – – Tiopronin 0.1 mM (r = 0.995)

—— —— —— Tiopronin 0.5 mM (r = 0.984)

———— ———— Tiopronin 1.0 mM (r = 0.996)

C_o = Bezugswert (Radioaktivität des an den Antikörper gebundenen ^{125}I-Insulins in Abwesenheit (o) von Ratteninsulin)

C_x = Meßwert (Radioaktivität des an den Antikörper gebundenen ^{125}I-Insulins in Anwesenheit (x) von Ratteninsulin)

4.6.3 Einfluß von 2-Mercaptopropionylglycin (Tiopronin) auf die Insulinsekretion bei stimulatorischer (11.1 mM) und substimulatorischer (2.8 mM) Glucosekonzentration

Die in Abb. 4.18 u. Tab. 4.12 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß Tiopronin bei keiner der hier verwendeten Konzentrationen zu einer signifikanten Steigerung der Glucose-induzierten Sekretion führt (I.).
Auch bei substimulatorischer Glucosekonzentration (II.) kommt es unter Einfluß von Tiopronin zu keinem Ansteigen über die Basalsekretion hinaus.

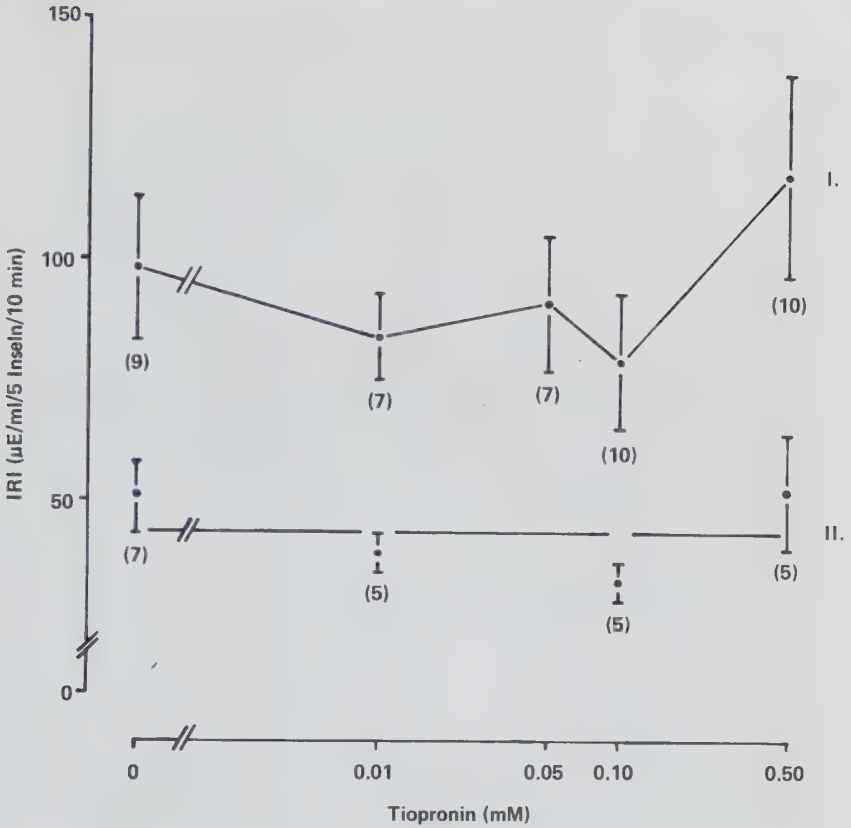


Abb. 4.18: Einfluß von 2-Mercaptopropionylglycin (Tiopronin) auf die Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte: I. Bei stimulatorischer Glucosekonzentration (11.1 mM); II. Bei substimulatorischer Glucosekonzentration (2.8 mM).

Gruppen von je 5 Inseln pro Netzgefäß wurden 30 Min. in 1.0 ml KRB-Lösung (+ 2% RSA) mit Glucose (2.8 bzw. 11.1 mM) bei 37°C im Wasserbad unter Carbogenbegasung inkubiert, anschließend das Medium gewechselt und unter Einfluß der dargestellten Konzentrationen von Tiopronin bei sonst gleichbleibenden Bedingungen 10 Min. weiterinkubiert.

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mittelwerte ± SEM

Tab. 4.12: Einfluß von 2-Mercaptopropionylglycin (Tiopronin) auf die Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte: I. bei stimulatorischer Glucosekonzentration (11.1 mM); II. bei substimulatorischer Glucosekonzentration (2.8 mM).

	Insulin (µE IRI/ml/5 Inseln/10 min)				
		Tiopronin (mM)			
		0.01	0.05	0.10	0.50
I. Glucose 11.1 mM	98.0 ± 14.9 (9) A	83.9 ± 8.9 (7) B	90.7 ± 13.9 (7) C	78.6 ± 13.6 (10) D	118.3 ± 20.5 (10) E
II. Glucose 2.8 mM	50.6 ± 7.3 (7) F	39.0 ± 4.1 (5) G	———	32.6 ± 4.0 (5) H	51.6 ± 11.8 (5) I

Gruppen von je 5 Inseln pro Netzgefäß wurden 30 Min. in 1.0 ml KRB-Lsg. (+ 2% RSA) mit Glucose (2.8 bzw. 11.1 mM) bei 37°C im Wasserbad unter Carbogenbegasung inkubiert, anschließend das Medium gewechselt und unter Einfluß der dargestellten Tiopronin-Konzentrationen bei sonst gleichbleibenden Bedingungen 10 Min. weiterinkubiert.

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mittelwerte ± SEM

t-Test: AB, AC, AD, AE } n.s. FG, FH, FI } n.s.

4.7 Vergleich der Thiole in Bezug auf die Stabilität der SH-Gruppe unter Inkubationsbedingungen

Die in Tab. 4.13 vorgenommene Aufstellung zeigt eine abnehmende Stabilität der SH-Gruppe von N-Acetyl-L-cystein zum L-Cystein-methylester bei beiden Ausgangskonzentrationen. Dies gilt ohne Ausnahme bei 0.1 mM, während GSH in 10-fach höherer Dosierung eine prozentuale Verschlechterung aufweist. N-Acetyl-L-cystein und Mesna weisen bei 1.0 mM identisches Stabilitätsverhalten auf. Auffallend ist die entscheidende Verbesserung im Stabilitätsverhalten bei beiden Cysteinester bei Übergang von 0.1 mM auf 1.0 mM. Abschließend ist festzustellen, daß mit Erhöhen der Thiolkonzentration im Bereich von 0.1 mM bis 1.0 mM eine Verbesserung im Stabilitätsverhalten während der Inkubation einhergeht (Ausnahme GSH).

Tab. 4.13: Vergleichende Aufstellung der verwendeten Thiole in Bezug auf die Stabilität der SH-Gruppe.

Thiol	0.1 mM	1.0 mM
	Gehalt[1]	
	%	%
N-Acetyl-L-cystein	89.5	94.5
GSH	82.6	79.1
Mesna	82.4	94.9
Tiopronin	75.3	92.8
L-Cystein-ethylester	44.9	89.8
L-Cystein-methylester	44.8	85.4

[1]Thiolgehalt nach 10-minütiger Inkubation in % der Ausgangskonzentration (0 min).

4.8 Vergleich der maximal synergistischen Effekte der untersuchten Thiole auf die durch Glucose (11.1 mM) induzierte Insulinsekretion

Die vergleichende Darstellung in Tab. 4.14 zeigt ähnliche Maximaleffekte für GSH (296%) und N-Acetyl-L-cystein (275%). Die maximale Wirkung von N-Acetyl-L-cystein wird allerdings erst durch eine 5-fache höhere Dosierung erreicht. Noch etwas geringere Affinitäten zeigen die beiden L-Cysteinester; ob allerdings bei den angegebenen Konzentrationen der Maximaleffekt bereits erreicht ist, kann aufgrund der bereits beschriebenen Gründe (s. 4.3.2 und 4.4.2) nicht abschließend beantwortet werden. Mesna und Tiopronin zeigen keine signifikanten Effekte (s. 4.5.3 und 4.6.3); daher entfällt eine Berücksichtigung in Tab. 4.14.

Tab. 4.14: Maximal synergistische Effekte der untersuchten Thiole auf die durch Glucose (11.1 mM) induzierte Insulinsekretion und die zur Erreichung notwendige jeweilige Konzentration.

Thiol	Konz. (mM)	Maximaler Effekt(%)
GSH	0.1	296
N-Acetyl-L-cystein	0.5	275
L-Cystein-methylester[1]	1.0	210
L-Cystein-ethylester[1]	1.0	173

[1] Angabe des maximal meßbaren Effektes, da aufgrund der starken Beeinflussung des RIA höhere Konzentrationen nicht mehr getestet werden konnten.

Angabe des Maximaleffektes erfolgt in % der über die jeweilige Basalsekretion hinaus durch Glucose (11.1 mM) freigesetzten Insulinmenge.

5. D I S K U S S I O N

5.1 Glutathion und Zellmembran-Thiolstatus

Verschiedene Membranfunktionen, einschließlich Ionen und Zuckertransport, Funktionen von Mitochondrien, die Freisetzung von Neurotransmitter und die Wirkung von Hormonen sind offensichtlich von einem entsprechenden Proteinthiol/-disulfid-Gleichgewicht abhängig; ein Gleichgewichtszustand, der durch Änderungen im GSH-Status der Zelle oder des Systems beeinflußt werden kann (KOSOWER u. KOSOWER, 1978). Vermittelt werden solche Änderungen durch Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen, die in eine Vielzahl biochemischer und zellulärer Prozeße, wie in die Reduktion und Bildung von Disulfidbrücken von Proteinen und Polypeptiden (FLOHE u. GÜNZLER, 1976; FAHEY, 1977; FREEDMAN, 1979; MANNERVIK u. AXELSSON, 1978, 1980) und in die Modulierung von Enzymaktivitäten (LUTHMAN et al., 1979; GILBERT, 1982) einbezogen sind, um nur zwei sehr wichtige Beispiele zu nennen.
Befunde der KOSOWERS (1983) scheinen es wert, an dieser Stelle etwas ausführlicher behandelt zu werden. Sie konnten für Erythrocyten bei Mensch und Ratte beweisen, daß GSH als Reduktionsmittel sowohl für Membranproteindisulfide als auch für cytoplasmatische Disulfide fungiert. Die Notwendigkeit von GSH wurde unterstrichen durch die Tatsache, daß ein direkter, NADPH-abhängiger Weg zur Reduktion von Membrandisulfiden nicht existiert. Der originale Thiolstatus der Zellmembran wird also nur über die laufende Bereitstellung von GSH durch die NADPH-abhängige Glutathion-Reduktase aufrechterhalten.
Die für die Weitergabe von Reduktionsäquivalenten von GSH auf die entsprechenden Disulfide notwendigen Enzym-

aktivitäten (GSH-Disulfid-Transhydrogenasen, Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen) konnten für viele Zellen nachgewiesen werden (LUTHMAN et al., 1979; MANNERVIK u. AXELSSON, 1978, 1980). Die Bedeutung des Glutaredoxin-Systems (HOLMGREN, 1983), das GSH-Disulfid-Oxidoreduktase- oder Transhydrogenase-Aktivitäten in Säugetierzellen zeigt, darf in diesem Zusammenhang nicht unerwähnt bleiben.
Auch in isolierten Langerhansschen Inseln ergaben biochemische Untersuchungen von KOHNERT et al. (1977) eine auffällig hohe Konzentration einer Thiol-Proteindisulfid-Oxidoreduktase (TPOR). Zusammen mit der von ANJANEYULU et al. (1982) in Inselzellhomogenaten von Ratten nachgewiesenen NADPH-abhängigen Glutathionreduktase verfügt die Langerhanssche Insel damit über die Enzymausstattung zur Übertragung von Redoxäquivalenten von NADPH über GSH auf relevante Membranproteindisulfide.
Die in diesem Abschnitt dargestellten Befunde unterstreichen die von AMMON et al. (1980) formulierte Hypothese, daß das GSH/GSSG-Redoxsystem auch in der B-Zelle über ein Enzymsystem mit einem membran-gebundenen Thiol/Disulfid-System gekoppelt ist und über die Änderung von Membraneigenschaften an der Regulation der Insulinsekretion beteiligt ist. Eine Beeinflussung des Zellmembranthiolstatus wäre dann einmal über den intrazellulären GSH-Gehalt und zum anderen durch direkte Einwirkung exogen zugeführter Thiole auf die B-Zellmembran möglich.

5.1.1 Beeinflussung des intrazellulären GSH-Gehaltes

5.1.1.1 Zufuhr von Vorstufen der GSH-Biosynthese

Glutathion (GSH) wird synthetisiert durch die aufeinanderfolgenden Aktionen der γ-Glutamylcystein-Synthetase

(Reaktion 1) und der Glutathion-Synthetase (Reaktion 2).

L-Glutamat + L-Cystein
+ ATP $\rightleftharpoons$ L-γ-Glu-L-CysH + ADP + P_i (1)

L-γ-Glu-L-Cysh + Glycin + ATP $\rightleftharpoons$ GSH + ADP + P_i (2)

Da L-Cystein, bedingt durch seine geringe intrazelluläre Konzentration, als die limitierende Aminosäure der GSH-Synthese angesehen werden muß (TATEISHI et al., 1974) und außerdem sehr schnell in die Zelle aufgenommen wird (REED u. BEATTY, 1978), lag es nahe, über ein vergrößertes Angebot von L-Cystein die Syntheserate von GSH zu erhöhen.
Bei gefasteten Ratten (40 h) führt eine Diät, die radioaktiv markiertes L-Cystein enthält, zu einem Ansteigen des GSH-Spiegels in der Leber. Zusatz von Protein und bestimmten Aminosäuren (z.B. Tryptophan) verringern bzw. unterdrücken diesen GSH-Anstieg. Tryptophan stimuliert stattdessen den Einbau von L-Cystein in Leber- und Serumprotein (TATEISHI u. HIGASHI, 1978). Die massive Zufuhr von Methionin, das zum Teil über den Cystathioninweg (s. 1.1.4) Cystein liefert, erhöht ebenfalls den GSH-Spiegel in der Leber (TATEISHI et al., 1981). Ein durch Paracetamol-Gabe verringerter GSH-Gehalt in der Leber von Mäusen wird durch i.p.-Applikation von L-Cystein (PURI u. MEISTER, 1983) oder von N-Acetyl-L-cystein (WILLIAMSON et al., 1982) wieder auf das ursprüngliche Niveau angehoben. Es kann davon ausgegangen werden, daß N-Acetyl-L-cystein in vivo deacetyliert wird und so L-Cystein für die GSH-Synthese bereitstellt. Entsprechende Aminosäure-N-Acylase-Aktivitäten wurden in Niere, Leber und in einer Anzahl anderer Gewebe nachgewiesen (BIRNBAUM et al., 1952).

Ein System, das Cystein erst intrazellulär freisetzt und so für die Biosynthese von Glutathion bereitstellt, wurde von WILLIAMSON u. MEISTER (1981) beschrieben. Die biochemische Basis dieses Cystein-liefernden Systems ist die Verabreichung eines synthetischen Substrates (L-2-Oxothiazolidin-4-carboxylat) der 5-Oxoprolinase, ein Enzym des γ-Glutamyl-Cycle, das normalerweise die Bildung von L-Glutamat aus 5-Oxo-L-prolin katalysiert (s. 1.1.4). Durch das 5-Oxoprolin-Analoge L-2-Oxothiazolidin-4-carboxylat, dessen Affinität zum Enzym sogar höher ist als die des natürlichen Substrats, wird jedoch der physiologische Reaktionsschritt zum Glutamat gehemmt und statt dessen das Thiazolidin in S-Carboxy-L-cystein umgewandelt, das spontan decarboxyliert und so intrazellulär L-Cystein bereitstellt. Die i.p.-Verabreichung dieser Substanz an gefastete Mäuse führt innerhalb von 4 Stunden zur Verdopplung des GSH-Gehaltes in der Leber. Da eine Zunahme von freiem Cystein nicht nachzuweisen war, kann davon ausgegangen werden, daß entstandenes Cystein unmittelbar für die GSH-Synthese verbraucht wurde.
Die durch Paracetamol bzw. Diethylmaleat verringerten GSH-Spiegel in der Leber von Mäusen konnten durch Gabe des Thiazolidins um 140 bzw. 160% über den Kontrollwert hinaus erhöht werden (WILLIAMSON et al., 1982). Relativiert wird dieser Befund jedoch dadurch, daß bereits der Kontrollwert bedingt durch Fasten der Tiere nicht mehr einem durchschnittlichen GSH-Spiegel entsprach.

Die hier dargestellten Befunde zeigen übereinstimmend eine Normalisierung der durch verschiedene Manipulationen (Fasten, Paracetamol- bzw. Diethylmaleat-Intoxikation) abgesenkten GSH-Spiegel. So ist bekannt, daß bei Ratten eintägiges Fasten den GSH-Gehalt der Leber auf einen Wert zwischen zwei Dritteln und der Hälfte der Ausgangskon-

zentration verringert (TATEISHI u. HIGASHI, 1978). Durch Paracetamol-Gabe (2.5 mmol/kg) wird der Leberglutathiongehalt bei Mäusen bis auf Werte zwischen 15 und 20% des Gehalts von unbehandelten Versuchstieren abgesenkt. Diethylmaleat (2 mmol/kg) verursacht eine Verringerung auf ca. 60% der Kontrolle (WILLIAMSON et al., 1982).

Nachfolgende Untersuchungsergebnisse machen deutlich, daß die Zufuhr von Biosynthesevorstufen bei nicht vorbehandelten Tieren den physiologischen GSH-Spiegel des jeweiligen Gewebes je nach zugeführter Vorstufe sehr unterschiedlich beeinflußt.
BEATTY u. REED (1981) konnten durch Inkubation (60 Min.) mit L-Cystein (3.0 mM) den GSH-Gehalt von isolierten Hepatocyten von Ratten nur um ca. 20% über den initialen GSH-Spiegel hinaus erhöhen. Erst die zusätzliche Verabreichung von Methionin brachte eine entscheidende Steigerung des GSH-Gehaltes.
Das durch s.c.-Applikation an Mäuse vergrößerte Angebot von L-Glutamat und L-Cystein führt nur zu einer geringfügigen Steigerung des GSH-Niveaus in der Niere (ANDERSON u. MEISTER, 1983). Die Rückkopplungs-Hemmung von GSH auf die γ-Glutamylcystein-Synthetase (RICHMAN u. MEISTER, 1975) ist wohl die Ursache dieses geringen Anstiegs. Wird jedoch dafür gesorgt, daß ausreichend γ-Glutamylcystein, das natürliche Substrat der GSH-Synthetase, in der Zelle zur Verfügung steht, so wird die auf den GSH-Spiegel regulierend einwirkende Feedback-Hemmung umgangen und wesentlich mehr GSH synthetisiert. Verringert man den GSH-Spiegel durch Gabe von DL-Buthionin-(SR)-Sulfoximin (BSO), einem selektiven Inhibitor der γ-Glutamylcystein-Synthetase (GRIFFITH u. MEISTER, 1979), so führt die anschließende Verabreichung von γ-Glutamylcystein zur Verdreifachung des

erniedrigten GSH-Gehalts (ANDERSON u. MEISTER, 1983). Diese Ergebnisse demonstrieren eine effektive Nutzung des γ-Glutamylcysteins für die GSH-Synthese.

5.1.1.2 Applikation von intaktem GSH

Der durch direkte Verabreichung von GSH ebenfalls zu beobachtende Anstieg des intrazellulären GSH-Niveaus der Niere ist wahrscheinlich auf die enzymatische Abspaltung von Glycin und Aufnahme von γ-Glutamylcystein zurückzuführen (ANDERSON u. MEISTER, 1983), denn es kann inzwischen als gesichert angesehen werden, daß intaktes GSH nicht in Zellen transportiert werden kann. Von DETHMERS u. MEISTER (1981) wurde beschrieben, daß Lymphoidzellen vom Menschen nicht in der Lage sind, intaktes GSH ins Zellinnere aufzunehmen. Bei der Perfusion von Rattenleber konnte ebenfalls keine Aufnahme von GSH beobachtet werden (HAHN u. OBERRAUCH, 1978). Auch isolierte Langerhanssche Inseln der Ratte zeigen kein Aufnahmevermögen für GSH, wie durch Versuche in unserem Labor demonstriert werden konnte (unveröffentlichte Befunde).

Zur Wirksamkeit von exogen zugeführtem GSH in Bezug auf eine Steigerung der intrazellulären GSH-Konzentration liegen unterschiedliche Befunde vor. Ein Anstieg des Glutathiongehaltes in der Niere nach i.p.-Injektion einer GSH-Lösung konnte für die Leber nicht bestätigt werden (PURI u. MEISTER, 1983).
Eine GSH-Behandlung kompensiert den durch Paracetamol verursachten Glutathionverlust der Leber nur sehr unvollständig (GAZZARD et al., 1974, PURI u. MEISTER, 1983). Während eine intravenöse Verabreichung einer GSH-Lösung an Mäuse nur einen begrenzten Schutz gegen Lebernekrose, Lipidperoxidation und GSH-Verluste bietet, liefert die Injektion von in Liposomen verkapseltem GSH einen opti-

malen Schutz gegen die durch Paracetamol induzierten Intoxikationen (WENDEL et al., 1982; WENDEL u. JAESCHKE, 1982). Der pharmakologische Effekt von GSH hängt demnach nicht vom absoluten Betrag der verabreichten GSH-Menge, sondern von der Form der Applikation ab. Die Autoren gehen davon aus, daß die Liposomen von Leberzellen (z.B. Kupffer Sternzellen) phagozytiert werden und auf diese Weise das GSH ins Zellinnere gelangt (WENDEL u. JAESCHKE, 1983).
Die Hypothese, daß die fehlende Membrangängigkeit die Wirksamkeit von intaktem GSH entscheidend begrenzt, konnte außerdem in Untersuchungen mit membrangängigeren Glutathionestern noch gestützt werden. Die Verabreichung (i.p.) des Methyl- bzw. Ethylesters an Mäuse hat eine Verdopplung des intrazellulären GSH in Leber und Niere zur Folge, erhöht den durch Buthionin-Sulfoximin abgesenkten GSH-Spiegel in den oben genannten Organen auf das Vierfache und kompensiert nicht nur den durch Paracetamol-Intoxikation induzierten GSH-Verlust, sondern erhöht den GSH-Spiegel noch zusätzlich (PURI u. MEISTER, 1983).

5.1.1.3 Intrazelluläre Freisetzung von GSH

Eine weitere Möglichkeit, den Gehalt an freiem Glutathion in der Zelle zu erhöhen, besteht in der Freisetzung von GSH aus gemischten Disulfiden zwischen Protein-SH und GSH (GSS-Protein), wie sie in unterschiedlichen Anteilen am Gesamtglutathion in einigen Geweben (HARDING, 1969; HARRAP et al., 1973) nachgewiesen werden konnten. In Ehrlich-Ascites-Tumorzellen, in denen 35% des gesamten GSH proteingebunden vorliegt (MODIG, 1968), kann durch Verabreichung von Cysteamin eine Freisetzung von GSH aus proteingebundenen Reservoirs bewirkt werden (MODIG et al., 1972). Auch für D-Penicillamin wird dieser Reaktionsmechanismus diskutiert (JELLUM u. SKREDES, 1976), zumal

inzwischen bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen durch Penicillamin-Behandlung über einen längeren Zeitraum ein allmählicher Anstieg des GSH-Niveaus in Erythrocyten festgestellt wurde (MUNTHE et al., 1979).

5.1.1.4 Zusammenfassende Bewertung

Vor einer Bewertung der unter 5.1.1 vorgestellten Befunde sollte nicht unerwähnt bleiben, daß der GSH-Gehalt verschiedener Organe der genannten Versuchstiere einem Tagesrhythmus unterliegt. Bei Mäusen z.B. zeigt der GSH-Gehalt der Leber ein Maximum von 63.0 ± 14.6 nmol/mg Protein zwischen 10 und 12 Uhr und ein Minimum von 44.1 ± 10.2 nmol/kg zwischen 18 und 20 Uhr (WENDEL u. JAESCHKE, 1983). Betrachtet man die angegebenen Standardabweichungen, so sind tägliche Schwankungen im Gehalt um den Faktor 2 nicht ungewöhnlich.
Der Erfolg, den GSH-Gehalt unter Berücksichtigung der beschriebenen Feed-back-Hemmung über die Biosynthese zu erhöhen, ist somit auch abhängig von der Tageszeit, in der die entsprechenden Daten gewonnen werden. Manche Unterschiede in den Befunden lassen sich durch diese Tatsache erklären.

Unbestritten scheint jedoch, daß durch Maßnahmen, die zur Bereitstellung von L-Cystein für die GSH-Biosynthese führen, ein durch Manipulationen verringerter GSH-Spiegel wieder auf den ursprünglichen Wert erhöht werden kann. Eine Erhöhung über den initialen Gehalt hinaus ist wahrscheinlich nur bis zum jeweiligen, durch den Feed-back-Mechanismus regulierten, Maximum möglich.
Eine entscheidende Beeinflussung des Cystein-Angebots über den Cystathionin-Weg durch Zufuhr von Methionin ist nach REED et al. (1983) nur in Hepatocyten von Bedeutung (s. auch 1.1.4).

Eine Anhebung des GSH-Gehalts über ein physiologisches Maximum hinaus mittels einer Biosynthesevorstufe ist nach ANDERSON u. MEISTER (1983) wohl nur unter Umgehung des Feed-back-Mechanismus durch Erhöhen der intrazellulären Konzentration von γ-Glutamylcystein möglich.

Um über die Zufuhr von exogenem GSH eine Erhöhung des intrazellulären GSH-Spiegels zu erreichen, ist es notwendig, daß durch die Form der Applikation die fehlende Membrangängigkeit von GSH aufgehoben wird.

Da der Anteil an proteingebundenem Glutathion je nach Versuchstier und Gewebe großen Schwankungen (1 - 50% des Gesamtglutathions) unterliegt (KOSOWER u. KOSOWER 1978), ist die Möglichkeit einer Freisetzung von GSH von sehr unterschiedlicher Bedeutung. Außerdem läßt die geringe Anzahl entsprechender Befunde keine eindeutige Stellungnahme zu.

5.1.2 Direkte Beeinflussung des Zellmembran-Thiolstatus durch exogene Thiole

Von HELLMAN et al. (1975b) konnte an Langerhansschen Inseln demonstriert werden, daß L-Cystein, das zur Aufhebung seiner Membrangängigkeit an Dextran gebunden wurde, die durch Glucose (10 mM) induzierte Insulinfreisetzung noch weiter steigert. Auch GSH, dessen fehlende Membrangängigkeit als intaktes Molekül inzwischen nachgewiesen werden konnte (s. 5.1.1.2), zeigt den gleichen synergistischen Effekt an isolierten Inseln (HELLMAN et al., 1975b, AMMON et al., 1984).
Diese Befunde geben deshalb begründeten Anlaß zu der Vermutung, daß exogen zugeführte Thiole ihre Wirkung möglicherweise durch direkte Einflußnahme auf die B-Zellmembran ausüben. Eine mögliche Erklärung ihres synergi-

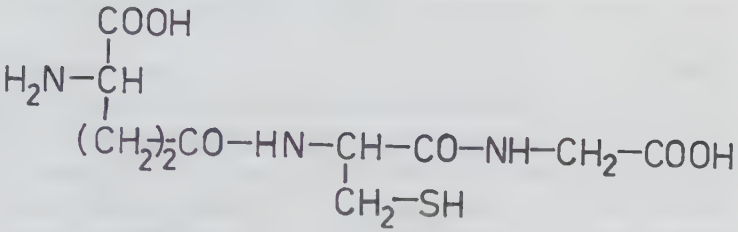
stischen Effekts auf die Insulinsekretion wäre die reduktive Spaltung von Membranproteindisulfiden. Interessant in diesem Zusammenhang sind Befunde der KOSOWERS (1983). Sie konnten durch Inkubation von mit Diamid vorbehandelten Erythrocyten mit GSH eine Reduktion von Membrandisulfiden nachweisen. Sie schließen daraus, daß GSH in der Lage ist, auch ohne cytoplasmatische Enzyme Membrandisulfide zu reduzieren. Allerdings ist eine physiologische Reduktion von Membrandisulfiden nur als Enzym-katalysierte Reaktion denkbar. Als mögliches Enzym schlagen sie eine membranständige Thiol-Proteindisulfid-Oxidoreduktase (TPOR) vor, ein Enzym, dessen Aktivitäten in vielen Geweben wie auch in Langerhansschen Inseln nachgewiesen werden konnten (s. 5.1). Der fehlende synergistische Effekt von an Dextran gebundener Mercaptobernsteinsäure (HELLMAN et al., 1975b) und die hemmende Wirkung des noch potenteren Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) auf die Sekretion von Insulin (LANDGRAF-LEURS, 1978), lassen zumindest vermuten, daß nicht alle Thiole, die in der Lage sind Membrandisulfide zu reduzieren, auch einen steigernden Effekt auf die Glucose-induzierte Insulinsekretion ausüben. Möglicherweise sind zur Reduktion von für die Insulinsekretion wichtigen Membrandisulfiden bestimmte strukturelle Eigenschaften des Thiols erforderlich.

5.2 Pharmakologische und therapeutische Aspekte der untersuchten Thiole

An dieser Stelle kann nicht auf alle bekannten pharmakologischen Einzelheiten und den daraus resultierenden Indikationen eingegangen werden, was auch das Thema und den Rahmen dieser Dissertation sprengen würde. Es sollen einige wichtige Erkenntnisse im Zusammenhang mit der

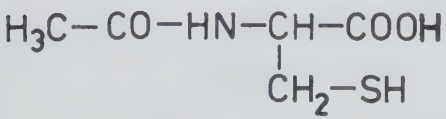
Einflußnahme von Thiolen auf -S-S-Bindungen und auf GSH-Gehalt dargestellt werden.

A. Glutathion reduziert (GSH)



Die physiologische Bedeutung von GSH wurde bereits ausführlich beschrieben (s. 1.1.4), so daß hier lediglich auf therapeutische Aspekte eingegangen werden muß.
Die Anwendung von GSH zur Behandlung der Leberzirrhose, der infektiösen Hepatitis, bestimmter Hautkrankheiten und des Alkoholismus erzielte nicht die erhofften Erfolge. Eine gewisse Rolle spielt GSH bei Vergiftungen, die zur Blockierung von Enzymen führen, die eine Thiol-(-SH)-Gruppe enthalten (MARTINDALE, 1982). Insgesamt gesehen besitzt GSH keine nennenswerte therapeutische Bedeutung.

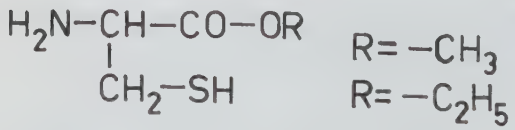
B. N-Acetyl-L-cystein



Eine große Bedeutung hat N-Acetyl-L-cystein als Mukolytikum erlangt (CHODOSH, 1980).
Bereits die Grundsubstanz L-Cystein führt in vitro zur

Verringerung der Viskosität von Mukoproteinen. Wesentlich hierfür ist das Vorliegen einer freien SH-Gruppierung (SHEFFNER, 1963). Aufgrund seiner Autoxidationsneigung und der Unlöslichkeit seines nicht mehr wirksamen Oxidationsprodukts Cystin ist jedoch die unsubstituierte Aminosäure zur Sekretverflüssigung wenig vorteilhaft.
So wurde mit Erfolg N-Acetyl-L-cystein zur Sekretverflüssigung bei bronchopulmonalen Erkrankungen entwickelt. Die gleichfalls vorhandene freie SH-Gruppierung wird durch den Carbonylsauerstoff der Acetyl-Gruppe abgeschirmt und neigt somit weniger zur Autoxidation. Trotz des erhöhten Oxidationspotentials ist die Herabsetzung der Viskosität von Mukoproteinen durch N-Acetyl-cystein ähnlich signifikant wie durch L-Cystein.
Der Wirkungsmechanismus liegt in der Zerstörung der kovalenten Bindungen der Disulfidbrücken. Die Spaltung der -S-S-Bindungen ruft eine Depolymerisation der Glucoproteine des Schleims und damit eine Verminderung der Viskosität hervor.
Zur Regeneration der Glutathionspeicher in der Leber (s. auch 5.1.1) bei Paracetamol-Intoxikation ist N-Acetyl-L-cystein das Mittel der Wahl (PRESCOTT, 1981; BREEN et al., 1982).

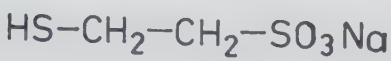
C. L-Cystein-methyl/-ethylester



Als weitere Derivate des L-Cysteins wurden neben N-Acetyl-L-cystein noch L-Cystein-methyl- und L-Cystein-ethylester für die Behandlung chronischer Bronchitis entwickelt (PALMER et al., 1962), erlangten aber aufgrund der gerin-

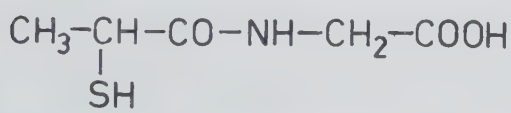
geren Stabilität der SH-Gruppe (BONANOMI u. GAZZANIGA, 1980) nicht die Bedeutung des N-Acetyl-L-cysteins.

D. Natrium-2-mercaptoethansulfonat (Mesna)



Mesna läßt sich ebenfalls in die Stoffgruppe der Mukolytika einordnen. Die Überlegenheit von Mesna in seiner mukolytischen Wirkung gegenüber dem N-Acetyl-L-cystein läßt sich neben der beschriebenen Wirkung der SH-Gruppe mit den zwei zusätzlich mukolytisch wirksamen Molekülgruppen begründen. Der Salzeffekt (Na^+) führt zum Anfeuchten des Schleims und zur Zerstörung der bivalenten Bindungen durch Substitution des Ca^{2+}-Ions durch das Na^+-Ion. Die lösende Wirkung der Sulfonatgruppe ($-SO_3^-$) trägt ebenfalls zur Schleimverflüssigung bei (BÜRGI, 1974; SKONDIA, 1983).
Die uroprotektive Wirksamkeit von Mesna beruht auf der Deaktivierung und Detoxifizierung von Oxazaphosphorin-Metaboliten im Urin (BROCK, 1982).

E. 2-Mercaptopropionylglycin (Tiopronin)



Tiopronin zeigt, bedingt durch die SH-Gruppe, ebenfalls mukolytische Eigenschaften. Tiopronin wird weiter eingesetzt als Antidot bei Schwermetallvergiftungen (Blei), in der Leberschutztherapie und bei Cystinurie (MARTINDALE, 1982).

5.3 Einfluß der untersuchten Thiole auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion

5.3.1 Glutathion reduziert (GSH)

Der bekannte synergistische Effekt der GSH-Konzentration 0.1 mM in Bezug auf die insulinfreisetzende Wirkung der Glucose bei Inseln von ob/ob-Mäusen (HELLMAN et al., 1975b) und von Wistar-Ratten (AMMON et al., 1984) konnte mit der geänderten Inkubationsmethode (s. 3.3.1) reproduziert werden. Die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung läßt nun zusätzliche Aussagen über Schwellendosis, Maximaleffekt und über die zur Erreichung des Maximaleffektes erforderliche (minimale) Dosis zu. Vergleichsmöglichkeiten mit anderen untersuchten Thiolen sind dadurch ebenfalls gegeben.
Die Inkubation Langerhansscher Inseln mit GSH in Gegenwart einer substimulatorischen Glucosekonzentration (2.8 mM) führt im gemessenen Konzentrationsbereich (0.01 - 0.50 mM) zu keiner Beeinflussung der Basalsekretion. Dagegen zeigt GSH bei stimulatorischer Glucosekonzentration (11.1 mM) im obigen Bereich einen synergistischen Effekt mit einer Signifikanz von $p < 0.005$ (Abb. 4.3 u. Tab. 4.2). Zur Erreichung des Maximaleffektes ist eine GSH-Dosis von 0.1 mM erforderlich (Tab. 4.14), eine Konzentration, die die Eichgerade des RIA nicht beeinflußt (Abb. 4.2) und die im Verlauf der Inkubation ein gutes Stabilitätsverhalten aufweist. Von dieser Dosis ist am Ende der Inkubation noch 82.6% als freies GSH nachweisbar (Tab. 4.13). Bei den während der Inkubation herrschenden Oxidationsbedingungen werden Thiole zu Disulfiden (hier GSSG und in einem sehr geringen Anteil GSS-Albumin) oxidiert (JOCELYN, 1972), so daß über die Dauer der Inkubation ein Glutathion/Glutathiondisulfid-Verhältnis > 4.7 vorgelegen hat. Mit 0.5 mM GSH konnte das Wirkungsmaximum aufrechterhalten werden; die Verwen-

dung höherer Konzentrationen war aus bereits beschriebenen Gründen nicht möglich (s. 4.1.2). Aufgrund der fehlenden Membrangängigkeit des intakten GSH-Moleküls (s. 5.1.1.2) muß der synergistische Effekt auf extrazelluläre Wechselwirkungen mit der B-Zellmembran zurückgeführt werden. Von HELLMAN et al. (1975b) wurde schon die Vermutung geäußert, daß es unter Einfluß von GSH möglicherweise zur Spaltung von Proteindisulfidbrücken der B-Zellmembran kommt. Daß GSH dazu durchaus in der Lage ist, zeigen die Ergebnisse von KOSOWER u. KOSOWER (1983), wonach die Inkubation der Membranen von mit Diamid vorbehandelten Erythrocyten mit GSH zur partiellen Reduktion von Membrandisulfiden führt. Denkbar wäre, daß der GSH-Konzentration im Blut generell eine regulatorische Bedeutung zukommt.
Für eine Abspaltung von Glycin und eine damit verbundene Aufnahme von γ-Glutamylcystein in die B-Zelle zur Erhöhung der GSH-Biosynthese gibt es keine Hinweise. Selbst wenn die Insel dazu in der Lage wäre, so ist es doch sehr fraglich, ob die dazu notwendigen biochemischen Prozesse innerhalb der kurzen Inkubationszeit (10 Min.) bereits zur Beeinflussung des GSH-Spiegels führen.

5.3.2 N-Acetyl-L-cystein

Im untersuchten Konzentrationsbereich (0.01 - 0.50 mM) zeigt N-Acetyl-L-cystein keine Beeinflussung der Basalsekretion (2.8 mM Glucose). Signifikant ($p < 0.005$) steigernde Effekte des Thiols auf die durch Glucose (11.1 mM) induzierte Insulinsekretion sind im Konzentrationsbereich von 0.05 - 0.50 mM nachweisbar. Der geringe Effekt (n.s.) bei 0.01 mM und der bereits sehr ausgeprägte Anstieg bei 0.05 mM ($p < 0.005$) läßt auf eine Schwellendosis zwischen den beiden Konzentrationen schließen (Abb. 4.6 u. Tab.4.4). Die maximale Wirkung ist bei einer Dosis von 0.5 mM erreicht (Tab. 4.14). Bereits bei einer Ausgangskonzentration von 0.1 mM zeigt N-Acetyl-L-cystein das beste Stabi-

litätsverhalten aller untersuchten Substanzen (Tab. 4.13). Von dieser Dosis sind noch 89,5% am Ende der Inkubation nachweisbar, was einem Thiol/Disulfid-Verhältnis > 8.5 über die Dauer der Inkubation entspricht.
Von N-Acetyl-L-cystein müssen in Bezug auf seinen Wirkungsmechanismus sowohl extrazelluläre wie auch intrazelluläre Effekte auf den Zellmembranthiolstatus angenommen werden. Die mukolytische Wirkung von N-Acetyl-L-cystein beruht auf der Spaltung von Disulfidbindungen der Polypeptidketten des Schleims (s. 5.2). Die Annahme, daß ein solcher Reaktionsmechanismus auch mit Disulfidbrücken von Membranproteinen möglich sein könnte, ist somit durchaus gerechtfertigt.
Als Mittel der Wahl bei Paracetamol-Intoxikationen (s.5.2) ist N-Acetyl-L-cystein in der Lage, die Bildung von intrazellulärem GSH in der Leber zu fördern (WILLIAMSON et al., 1982). Aufgrund der Membrangängigkeit ist es zumindest nicht auszuschließen, daß auch in der B-Zelle eine Regeneration des GSH-Spiegels durch N-Acetyl-L-cystein möglich ist. Ob aber in der zur Verfügung stehenden Inkubationszeit nach Aufnahme ins Zellinnere und enzymatischer Deacetylierung der GSH-Spiegel noch entscheidend beeinflußt werden kann, ist nach Erkenntnissen aus anderen Geweben (WILLIAMSON et al., 1982) doch sehr fraglich.

5.3.3 L-Cystein-methyl/-ethylester

Die beiden untersuchten Ester des L-Cysteins zeigen, bedingt durch den nur geringen Unterschied in der chemischen Struktur, bei allen untersuchten Parameter (Stabilität, Einfluß auf Eichgerade, Einfluß auf Insulinsekretion) nahezu identisches Verhalten. Eine zusammenfassende Bewertung beider Substanzen ist deshalb sinnvoll.
Beide Ester sind nicht in der Lage, als Stimulatoren der Insulinsekretion zu wirken, denn eine Beeinflussung der

Basalsekretion konnte nicht gezeigt werden. Jedoch steigern beide die durch Glucose (11.1 mM) stimulierte Insulinsekretion im Konzentrationsbereich von 0.1 - 1.0 mM mit signifikantem Effekt ($p < 0.05$) bei 0.5 und 1.0 mM (Abb. 4.9, Tab. 4.6 u. Abb. 4.12, Tab. 4.8). Höhere Konzentrationen konnten aufgrund der starken Beeinflussung der Eichgerade des RIA nicht mehr untersucht werden (s. 4.3.2 u. 4.4.2). Aus diesem Grunde war die Erstellung einer vollständigen Dosis-Wirkungs-Kurve nicht durchführbar; eine Aussage über die Lage des Wirkungsmaximums deshalb nicht möglich. Der maximal meßbare synergistische Effekt beider Ester liegt bei einer Dosis von 1.0 mM (Tab. 4.14), von der am Ende der Inkubation noch 85.4% (L-Cystein-methylester) bzw. 89.8% (L-Cysteinethylester) gemessen werden können. Diese beiden Werte entsprechen einem Thiol/Disulfid-Quotienten > 5.8 bzw. 8.8 über den gesamten Inkubationszeitraum.
Von der Grundsubstanz L-Cystein ist bekannt, daß sie sowohl an Dextran gebunden (HELLMAN et al., 1975b) wie auch als freie Aminosäure (ENZ, 1984) die Glucose-induzierte Insulinsekretion der Langerhansschen Insel steigert. Nicht membrangängiges dextrangebundenes Cystein zeigt diesen synergistischen Effekt bei Konzentration der Thiolgruppe von 0.1 mM, während von der freien membrangängigen Aminosäure wesentlich höhere Konzentrationen (3.0 - 5.0 mM) erforderlich sind. Diese doch sehr große Differenz zwischen den jeweils synergistisch wirkenden Konzentrationen erklärt sich neben methodischen Einflüssen mit der starken Autoxidations-Neigung der freien Aminosäure, während die SH-Gruppe des Cysteins durch die Bindung an Dextran eine wesentlich größere Stabilität zeigt (HELLMAN et al., 1975b).
Die hier eingesetzten Cysteinester neigen im Vergleich zur Muttersubstanz weniger zur Autoxidation. So zeigt unter identischen Inkubationsbedingungen eine Lösung von

je 1 mMol/l jedes Esters nahezu die gleichen prozentualen Konzentrationsabnahmen (Tab. 4.5 u. 4.7) wie eine Lösung von 5 mMol/l der unveresterten Aminosäure (ENZ, 1984).
Was den Wirkungsmechanismus von Cystein in seiner dextrangebundenen Form anbelangt, wurde von HELLMAN et al., (1975b) eine extrazelluläre Beeinflussung der Plasmamembran der B-Zelle diskutiert (s. 5.1.2).
Von der freien Aminosäure und ihren Estern muß als extrazellulärer Wirkungsmechanismus ebenfalls eine Reduktion von Disulfidbrücken von Membranproteinen angenommen werden. Aufgrund der Membrangängigkeit von Cystein und seinen Estern ist jedoch auch eine zusätzliche Beeinflussung des intrazellulären GSH-Spiegels denkbar. Von Hepatocyten ist eine sehr schnelle initiale Cystein-Aufnahme während der ersten 30 Minuten der Inkubation mit Cystein (0.16 mM) nachgewiesen. Zugabe von Methionin (0.67 mM) wirkt sich erst etwa ab der 60. Minute auf den intrazellulären Cystein-Gehalt aus. Nach 10 Minuten sind bereits geringe [^{35}S]-Cystein-Aktivitäten im intrazellulären GSH nachweisbar (REED u. BEATTY, 1978). Durch Inkubation der Hepatocyten mit einer wesentlich höheren L-Cystein-Konzentration (3 mM) und mit Methionin (0.67 mM) kommt es zu einer 30-fachen Erhöhung des intrazellulären Cystein-Gehalts während einer 10-minütigen Inkubation (BEATTY u. REED, 1981). Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf die Langerhanssche Insel ist zwar nicht möglich, trotzdem muß auch für die Insel eine laufende Bereitstellung von L-Cystein für die Regeneration von GSH angenommen werden.

5.3.4 Mesna und Tiopronin

Obwohl beide Thiole über eine relativ stabile SH-Gruppe verfügen und damit ein dem GSH vergleichbares Stabilitätsverhalten aufweisen (Tab. 4.13), kommt es im untersuchten

Konzentrationsbereich (0.01 - 0.50 mM) bei beiden Substanzen weder zu einer signifikanten Steigerung der Basalsekretion noch zur Erhöhung der durch Glucose (11.1 mM) stimulierten Insulinsekretion (Mesna: Abb.4.15, Tab. 4.10; Tiopronin: Abb. 4.18, Tab. 4.12). Mesna und Tiopronin zeigen somit nicht die mit GSH und den Cysteinderivaten erhaltenen potenzierenden Effekte. Beide Thiole führen zu keiner signifikanten Beeinflussung der Insulinsekretion.
Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß allein die Fähigkeit zur einfachen chemischen Reduktion von Disulfiden nicht ausreicht, um die durch Glucose ausgelöste Insulinsekretion synergistisch zu beeinflussen.

5.4 Beziehungen zwischen chemischer Struktur und biologischem Effekt

Die Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel, induziert durch eine nicht maximal stimulierende Glucosekonzentration (11.1 mM), wird durch GSH und die Cystein-Derivate (N-Acetyl-L-cystein, L-Cystein-methylester, L-Cystein-ethylester) noch weiter gesteigert (s. 4.1 - 4.4).
Synergistische Effekte werden bei Konzentrationen der obigen Thiole erhalten, die über den Inkubationszeitraum hinweg relativ stabil sind. Von allen untersuchten Thiolen wird jedoch ein Maximum an Wirkung bei den Ausgangskonzentrationen erhalten, die auch am Ende der Inkubation noch zu über 80% nachweisbar waren (s. Tab. 4.13 u. Tab. 4.14), was in etwa einem Thiol/Disulfid-Verhältnis > 4 über die gesamte Inkubationszeit entspricht. Dies bedeutet, daß der maximal synergistische Effekt bei den Konzentrationen der Cystein-Derivate (einschließlich GSH) auftritt, die für die Dauer der Inkubation die Bereit-

stellung eines sehr hohen Anteils an freier SH-Gruppe (im Vergleich zum Disulfid) gewährleisten.
Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Verfügbarkeit einer freien SH-Gruppe für den synergistischen Effekt auf die Glucose-induzierte Insulinsekretion eine Vorbedingung darstellt. Daß die SH-Gruppe für diese synergistische Wirkung eine entscheidende Rolle spielt, belegen auch Ergebnisse, wonach Disulfide wie GSSG (HELLMAN et al., 1975b) und Cystin (ENZ, 1984) in Konzentrationen, bei denen das zugehörige Thiol einen synergistischen Effekt zeigt, zu keiner Potenzierung der Insulinsekretion führen. Auch bei Cystein-Derivaten wie S-Carboxymethyl-cystein und S-Carbamoyl-cystein, die über keine freie Thiolgruppe verfügen, fehlt der synergistische Effekt auf die Insulinsekretion (unveröffentlichte Befunde). Die durchgeführten Untersuchungen mit Mesna (s. 4.5.3) und Tiopronin (s. 4.6.3) zeigen jedoch, daß nicht alle Substanzen mit einer freien SH-Gruppe diese synergistische Wirkung zusammen mit Glucose auslösen. Dies gilt auch für Dithiole (unveröffentlichte Daten) und wie bereits erwähnt (s. 5.1.2) für Mercaptobernsteinsäure (HELLMAN et al., 1975b) und für Dithiothreitol (LANDGRAF-LEURS, 1978).
Die Vermutung ist deshalb gerechtfertigt, daß möglicherweise nur solche Thiole eine potenzierende Wirkung auf die Insulinsekretion aufweisen, die über die Aminosäurestruktur von Cystein verfügen. Trifft dies zu, so ist der synergistische Effekt der Thiole auf die Insulinsekretion nicht die Konsequenz eines einfachen chemischen Thiol-Disulfid-Austausches, sondern einer Enzym-katalysierten Reduktion von für die Freisetzung von Insulin relevanten Membrandisulfiden. Für dieses Enzymsystem stellen dann GSH und Cysteinderivate geeignete Substrate dar.

5.4.1 Affinität und biologische Aktivität

Obwohl es nicht möglich war, bei jeder Substanz die Dosis-Wirkungs-Kurve komplett zu erstellen, erlaubt Form und Lage der Kurven im Koordinatensystem tendenzielle Schlüsse über Affinität und biologische Aktivität der synergistisch wirkenden Thiole zu ziehen. Betrachtet man den Konzentrationsbereich der synergistischen Effekte der untersuchten Cystein-Derivate, so läßt sich folgende Reihenfolge erstellen: GSH 0.01 - 0.1 mM, N-Acetyl-L-cystein 0.05 - 0.5 mM, L-Cysteinmethylester und -ethylester 0.5 - 1.0 mM (jeweils kleinste Dosis bei der ein signifikanter Effekt auftritt und die zur Erreichung des Maximaleffektes erforderliche Konzentration).
Diese Daten weisen darauf hin, daß reduziertes Glutathion die höchste Affinität zum vermuteten Enzym (s. 5.4) aufweist, gefolgt von N-Acetyl-L-cystein, während die Cysteinester den maximal meßbaren Effekt erst bei einer 10-fach höheren Thiolkonzentration als GSH zeigen.
Vergleicht man die biologische Aktivität, so sind kaum Unterschiede zwischen GSH (196%) und N-Acetyl-L-cystein (175%) festzustellen. Bei den geringeren biologischen Aktivitäten der beiden Cysteinester (L-Cystein-methylester 110%, L-Cystein-ethylester 73%) muß allerdings berücksichtigt werden, daß diese Werte möglicherweise noch nicht dem Maximum der Wirkung entsprechen, da aus bereits beschriebenen Gründen (s. 5.3.3) die Dosis-Wirkungs-Kurve nur bis zu einer Thiolkonzentration von 1.0 mM geführt werden konnte. Es ist deshalb durchaus denkbar, daß die biologischen Aktivitäten dieser beiden Cysteinester im jeweiligen Maximum ähnliche Werte wie GSH und N-Acetyl-L-cystein aufweisen.

5.5 Mögliche Lokalisation der Thiolwirkung

Nach der von AMMON et al. (1980) formulierten Hypothese sind Thiolgruppen der B-Zellmembran an der Insulin-freisetzenden Wirkung der Glucose beteiligt. Diese Membranprotein-Sulfhydrylgruppen werden durch das intrazelluläre Glutathionsystem, das über PPS und NADPH und damit über den Glucosemetabolismus beeinflußbar ist, in reduziertem Zustand gehalten.
Dazu ist es allerdings erforderlich, daß GSH in die Nähe der Membrandisulfide gelangt. Für eine Reihe von Geweben konnte der Nachweis erbracht werden, daß ein Transport von intrazellulärem GSH aus dem Zellinnern durch die Zellmembran ins Plasma bzw. in den Extrazellulärraum existiert (BANNAI u. TSUKEDA, 1979; BARTOLI u. SIES, 1978; GRIFFITH et al., 1979; MEISTER et al., 1980). Wahrscheinlich handelt es sich dabei um den physiologischen Mechanismus, durch den im Rahmen des γ-Glutamyl-Cycle der membranständigen γ-Glutamyl-Transpeptidase (γ-GTP) GSH zugeführt wird (MEISTER, 1978). Das Vorhandensein von γ-GTP-Aktivität in Langerhansschen Inseln (ANJANEYULU et al., 1981) schafft auch in der B-Zelle die Voraussetzung für diesen GSH-Transport, der als eine Eigenschaft vieler, wenn nicht der meisten Zellen, betrachtet werden kann (MEISTER, 1983). Man kann davon ausgehen, daß GSH auf seinem Weg zur γ-GTP, die an der äußeren Zellmembran lokalisiert ist, auch anderen biochemischen Prozessen an (in) der Zellmembran zur Verfügung steht, zumal die meisten untersuchten Gewebe mit Ausnahme der Niere aufgrund ihrer niedrigen γ-GTP-Spiegel nicht in der Lage sind, das gesamte transportierte GSH zu verstoffwechseln (MEISTER, 1983). Eine wesentliche Rolle des GSH-Efflux sieht der zitierte Autor deshalb im Schutz der jeweiligen Zellmembran, indem essentielle SH-Gruppen durch GSH im reduzierten Zustand gehalten werden.

Trifft dies auch für die B-Zelle zu, so wäre denkbar, daß eine membranständige Dehydrogenase (Oxidoreduktase) sowohl intrazelluläres wie auch exogen zugeführtes GSH als Substrat zur Reduktion von Membrandisulfiden verwendet. Ein Enzym, das für eine solche Reduktion in Frage käme, wurde von DORN et al. (1978) in der B-Zellmembran der Ratte immunohistochemisch nachgewiesen und in Zusammenhang mit der Insulinabgabe gebracht. Die nachgewiesene Thiol-Proteindisulfid-Oxidoreduktase (TPOR) katalysiert Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen nach folgendem Reaktionsschema:

$$R_1\text{-S-S-}R_2 + 2R_3\text{-SH} \overset{\text{TPOR}}{\rightleftharpoons} R_1\text{-SH} + R_2\text{-SH} + R_3\text{-S-S-}R_3$$

R_1,R_2: Peptidketten

R_3-SH: nieder- und hochmolekulare Thiole

Enzymaktivitäten dieser TPOR mit unterschiedlichen biologischen Funktionen konnten in vielen Zellen gefunden werden (MORIN et al., 1983). Dabei konnte gezeigt werden, daß GSH als Substrat dieses Enzyms bei verschiedenen Thiol/Disulfid-Austauschreaktionen dient. Es ist deshalb denkbar, daß exogen zugeführtes GSH möglicherweise als physiologisches Substrat einer membranständigen Thiol-Protein-Oxidoreduktase zur Reduktion von für die Insulinfreisetzende Wirkung der Glucose wichtigen Disulfidbrücken der B-Zellmembran führt. Aufgrund der breiten Substratspezifität ist es möglich, daß auch Cystein und seine Derivate wie N-Acetyl-L-cystein und Cystein-ester anstelle von GSH als Substrate fungieren.
Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß Cystein und die genannten Derivate in die B-Zelle eindringen und als Präcursoren der intrazellulären GSH-Synthese dienen (s. 5.1.1.1).

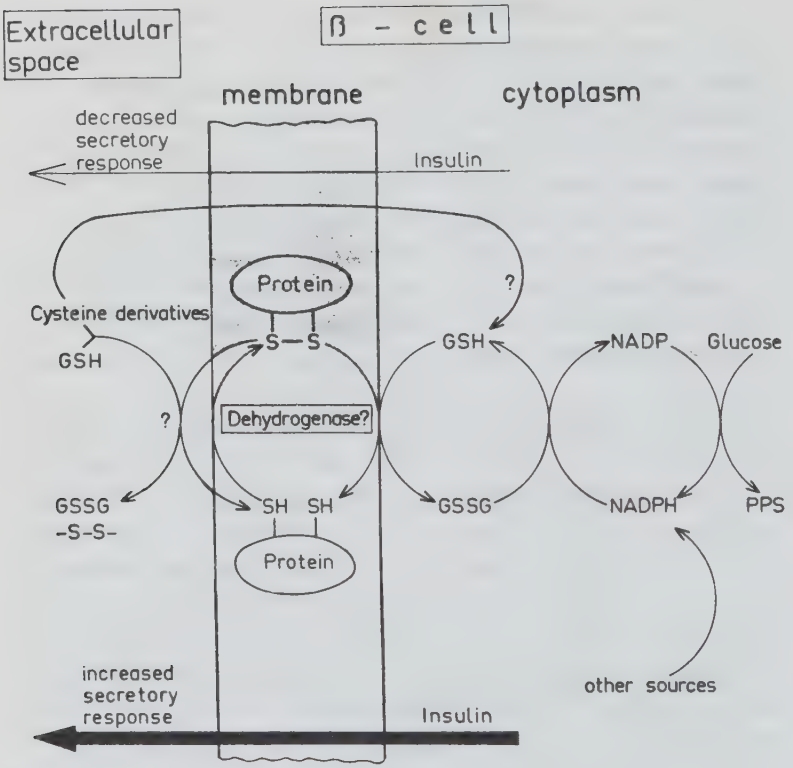


Abb. 5.1: Schematische Darstellung des möglichen Wirkungsmechanismus von exogen zugeführtem GSH und Cystein-Derivaten bei der durch Glucose stimulierten Sekretion von Insulin.

Ein weiterer Mechanismus, für den es allerdings in Bezug auf die untersuchten Substanzen noch keine Hinweise gibt, könnte die Freisetzung von proteingebundenem GSH durch membrangängige Thiole sein (s. 5.1.1.3). Beide Mechanismen sind möglicherweise auch in der B-Zelle in der Lage, die Verfügbarkeit von intrazellulärem GSH für die Reduktion von Membrandisulfiden zu erhöhen.

Die schematische Darstellung in Abb. 5.1 erweitert die von AMMON et al. (1980) dargestellten Zusammenhänge (Abb. 1.3) um die in diesem Abschnitt beschriebene Einflußnahme von exogenem GSH und Cystein-Derivaten über eine postulierte Dehydrogenase (Oxidoreduktase) auf den Redoxstatus des Membranthiol/-disulfid-Systems. Eine mögliche Beeinflussung des intrazellulären GSH kommt darin ebenfalls zum Ausdruck.

6. Z U S A M M E N F A S S U N G

6.1 Fragestellung

1. Die Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte sollte hinsichtlich ihrer Beeinflußbarkeit durch Substanzen mit einer freien SH-Gruppe untersucht werden.

2. Von diesen Thiolen sollten Beziehungen zwischen ihrer Dosis (bzw. Konzentration) und ihrer Wirkung auf die Insulinsekretion bei stimulatorischer (11.1 mM) und substimulatorischer (2.8 mM) Glucosekonzentration erstellt werden. Eine sich anschließende vergleichende Auswertung der Ergebnisse der geprüften Thiole (mit reduziertem Glutathion als Modellsubstanz) sollte tendenzielle Aussagen über Struktur-Wirkungs-Beziehungen ermöglichen.

3. In vorausgehenden Untersuchungen sollte der zu testende Konzentrationsbereich des jeweiligen Thiols in der Höhe so begrenzt werden, daß eine entscheidende Beeinflussung des Radioimmunoassays und eine damit verbundene fehlerhafte Auswertung der Versuche vermieden wird.

4. Untersuchungen zur Stabilität der SH-Gruppe der jeweiligen Substanz unter Inkubationsbedingungen sollten Korrelationen zwischen Stabilität und Wirkung des Thiols ermöglichen.

6.2 Versuchsergebnisse

1. Durch die Untersuchungen über die Beeinflussung des Insulin-Radioimmunoassay in Abhängigkeit von der Thiolkonzentration konnte für jedes verwendete Thiol eine Höchstkonzentration festgelegt werden, durch die der zu untersuchende Konzentrationsbereich nach oben begrenzt wurde.

2. Für alle in dieser Arbeit untersuchten Thiole kann generell festgestellt werden, daß sie im jeweiligen Konzentrationsbereich zu keiner Beeinflussung der Basalsekretion (Glucose 2.8 mM) führen.
Die Untersuchungen zur Beeinflussung der Glucose-induzierten Insulinsekretion durch die Thiole führten im einzelnen zu folgenden Ergebnissen:

a) Reduziertes Glutathion (GSH) führt im untersuchten Konzentrationsbereich (0.01 - 0.50 mM) zur signifikanten Steigerung der Insulinsekretion bei stimulatorischer Glucose-Konzentration (11.1 mM). Der Maximaleffekt (296%) ist bei einer GSH-Dosis von 0.1 mM erreicht.

b) Synergistische Effekte von N-Acetyl-L-cystein auf die Glucose-induzierte (11.1 mM) Sekretion von Insulin sind im Bereich von 0.05 - 0.50 mM signifikant nachweisbar. Die zur Erreichung des Maximaleffektes (275%) erforderliche Dosis liegt bei 0.5 mM N-Acetyl-L-cystein.

c) L-Cystein-methylester und -ethylester zeigen hinsichtlich ihrer synergistischen Effekte auf die durch Glucose (11.1 mM) ausgelöste Insulinsekretion nahezu identisches Verhalten. Signifikant nachweisbare Stei-

gerungen konnten jeweils bei 0.5 bis 1.0 mM gefunden werden. Da die Dosis-Wirkungs-Kurven nicht komplett erstellt werden konnten, kann nicht beurteilt werden, ob bei einer Dosierung von 1.0 mM bei L-Cystein-methylester (210%) und -ethylester (173%) der jeweils in Klammern angegebene Wert bereits dem Maximaleffekt entspricht.

d) Natrium-2-mercaptoethansulfonat (Mesna) und 2-Mercaptopropionylglycin (Tiopronin) führen im untersuchten Dosis-Bereich (0.01 - 0.50 mM) zu keiner signifikanten Beeinflussung der durch Glucose (11.1 mM) ausgelösten Insulinsekretion.

3. Von allen Thiolen mit synergistischem Effekt wurde jeweils ein Maximum an Wirkung bei einer Ausgangskonzentration erhalten, die auch am Ende der Inkubation je nach Thiol noch in einem Bereich zwischen 80 und 90% nachzuweisen war.

4. Die Affinität der Substanzen, beurteilt nach Lage der Dosis-Wirkungs-Kurve im Koordinatensystem nimmt in der Reihenfolge L-Cystein-ethylester < L-Cystein-methylester < N-Acetyl-L-cystein < GSH zu, wobei nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Estern festzustellen sind. Dieselbe Reihenfolge ergibt sich auch bei Betrachtung der maximal synergistischen Effekte, allerdings mit der beschriebenen Einschränkung bei den beiden Cysteinestern.

6.3 Schlußfolgerungen

1. Reduziertes Glutathion, N-Acetyl-L-cystein und die beiden L-Cysteinester verstärken die durch Glucose (11.1 mM) stimulierte Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte. Sie sind jedoch nicht in der Lage als Stimulatoren der Insulinsekretion zu wirken. Der für eine maximale Wirkung erforderliche hohe Redox-Quotient (Thiol/Disulfid) unterstreicht die Notwendigkeit der freien SH-Gruppe für den synergistischen Effekt.

2. Die fehlenden Effekte von Mesna und Tiopronin deuten darauf hin, daß der synergistischen Wirkung der Cystein-Derivate kein einfacher chemischer Thiol-Disulfid-Austausch zugrunde liegt, sondern eine durch ein Enzym (Oxidoreduktase) katalysierte Reduktion von für die Freisetzung von Insulin wichtigen Membrandisulfiden.

3. Da reduziertes Glutathion die potenteste Wirkung aufweist, scheint es, wie in anderen Geweben nachgewiesen, das physiologische Substrat der Oxidoreduktase zu sein. Substanzen mit Cystein-Komponente im Molekül könnten ebenfalls als Substrate in Frage kommen.

4. Neben der möglichen extrazellulären Beeinflussung von Membrandisulfiden kann nicht ausgeschlossen werden, daß membrangängige Cystein-Derivate (N-Acetyl-L-cystein, L-Cystein-ester) als Vorstufen der GSH-Biosynthese dienen und so die Verfügbarkeit von intrazellulärem GSH für die Reduktion von Membrandisulfiden erhöhen.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Abdel-Hamid, M.A. (1983)
Dissertation
Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Tübingen

Agren, A., Berne, C., Brolin, S.E. (1978)
The activity of glutathione reductase in A_2-cell and B-cell-rich pancreatic islets.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 427-429

Akhtar, M.S., Verspohl, E.J., Hegner, D., Ammon, H.P.T. (1977)
Phosphogluconate/glucose-6-phosphate ratio in rat pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin.
Diabetes 26, 857-863

Ammon, H.P.T., Steinke, J. (1972)
6-Aminonicotinamide (6-AN) as a diabetogenic agent. In vitro and in vivo studies in the rat.
Diabetes 21, 143-148

Ammon, H.P.T., Patel, T.N., Steinke, J. (1973)
The role of the pentose phosphate shunt in glucose-induced insulin release: In vitro studies with 6-amino-nicotinamide, methylene blue, NAD^+, NADH, $NADP^+$, NADPH and nicotinamide on isolated pancreatic rat islets.
Biochim. Biophys. Acta 297, 352-367

Ammon, H.P.T., Verspohl, E.J. (1976)
Pyridine nucleotides in pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin.
Endocrinology 99, 1469-1476

Ammon, H.P.T., Akhtar, M.S., Niklas, H., Hegner, D. (1977)
Inhibition of p-chloromercuribenzoate- and glucose-induced insulin release in vitro by methylene blue, diamide and tert-butylhydroperoxide.
Mol. Pharmacol. 13, 598-605

Ammon, H.P.T., Hoppe, E., Akhtar, M.S., Niklas, H. (1979a)
Effect of leucine on the pyridine nucleotide contents of islets and on the insulin released-interactions in vitro with methylene blue, thiol oxidants and p-chloro-mercuribenzoate.
Diabetes 28, 593-599

Ammon, H.P.T., Akhtar, M.S., Grimm, A., Niklas, H. (1979b)
Effect of methylene blue and thiol oxidants on pancreatic islet GSH/GSSG ratios and tolbutamide mediated insulin release in vitro.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 307, 91-96

Ammon, H.P.T., Verspohl, E.J. (1979)
Effects of methylene blue on pyridine nucleotides and insulin secretion of rat pancreatic islets.
Diabetologia 17, 41-44

Ammon, H.P.T., Grimm, A., Lutz, S., Wagner-Teschner, D., Händel, M., Hagenloh, I. (1980)
Islet glutathione and insulin release.
Diabetes 29, 830-834

Ammon, H.P.T., Abdel-Hamid, M. (1981)
Potentiation of the insulin-releasing capacity of tolbutamide by thiols: Studies on the isolated perfused pancreas.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 317, 262-267

Ammon, H.P.T., Hoppe, E., Eujen, R. Lutz, S. (1981)
Effect of leucine on GSH levels of rat pancreatic islets.
Horm. Metab. Res. 13, 60-61

Ammon, H.P.T., Hägele, R., Youssif, N., Eujen, R., El-Amri, N. (1983)
A possible role of intracellular and membrane thiols of rat pancreatic islets in calcium uptake and insulin release.
Endocrinology 112, 720-726

Ammon, H.P.T., Abdel-Hamid, M., Rao, P.G., Enz, G. (1984)
Thiol-dependent and non-thiol-dependent stimulations of insulin release.
Diabetes 33, 251-257

Anderson, M.E., Meister, A. (1983)
Transport and direct utilization of γ-glutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 707-711

Anjaneyulu, K., Anjaneyulu, R., Sener, A., Malaisse, W.J. (1981)
γ-Glutamyltranspeptidase activity in pancreatic islets.
FEBS Lett. 125, 57-59

Anjaneyulu, K., Anjaneyulu, R., Sener, A., Malaisse, W.J. (1982)
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Thiol/disulfide balance in pancreatic islets.
Biochimie 64, 29-36

Ashcroft, S.J.H., Hedeskov, C.J., Randle, P.J. (1970)
Glucose metabolism in mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 118, 143-154

Ashcroft, S.J.H., Randle, P.J. (1970)
Enzymes of glucose metabolism in normal mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 119, 5-15

Ashcroft, S.J.H., Randle, P.J., Täljedal, I.-B. (1972a)
Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in normal mouse pancreatic islets.
FEBS Lett. 20, 263-266

Ashcroft, S.J.H., Bassett, J.M., Randle, P.J. (1972b)
Insulin secretion mechanisms and glucose metabolism in isolated islets.
Diabetes 21, Suppl. 2, 538-545

Ashcroft, S.J.H., Weerasinghe, L.C.C., Bassett, J.M., Randle, P.J. (1972c)
The pentose cycle and insulin release in mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 126, 525-532

Ashcroft, S.J.H., Chatra, L., Weerasinghe, C., Randle, P.J. (1973)
Interrelationship of islet metabolism, adenosine triphosphate content and insulin release.
Biochem. J. 132, 223-231

Ashcroft, S.J.H, Randle, P.J. (1975)
The pancreas and insulin release.
In: Diabtes. Its physiological and biochemical basis, ed. by J. Vallance-Owen. MTP Press, Lancaster, pp 31-62

Ashcroft, S.J.H., Bunce, J., Lowry, M., Hansen, S.E., Hedeskov, C.J. (1978)
The effect of sugars on (pro)insulin biosynthesis.
Biochem. J. 174, 517-526

Ashcroft, S.J.H., Christie, M.R. (1979)
Effects of glucose on the cytosolic ratio of reduced/oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in rat islets of Langerhans.
Biochem. J. 184, 697-700

Ashcroft, S.J.H. (1980)
Glucoreceptor Mechanisms and the Control of Insulin Release and Biosynthesis.
Diabetologia 18, 5-15

Bannai, S., Tsukeda, H. (1979)
The export of glutathione from human diploid cells in culture.
J. Biol. Chem. 254, 3444-3450

Bartoli, G.M., Sies, H. (1978)
Reduced and oxidized glutathione efflux from liver.
FEBS Lett. 86, 89-91

Beatty, P.W., Reed, D.J. (1980)
Involvement of the cystathionine pathway in the biosynthesis of glutathione by isolated rat hepatocytes.
Arch. Biochem. Biophys. 204, 80-87

Beatty, P.W., Reed, D.J. (1981)
Influence of cysteine upon the glutathione status of isolated rat hepatocytes.
Biochem. Pharmacol. 30, 1227-1230

Birnbaum, S.M., Levintow, L., Kingley, R.B., Greenstein, J.P. (1952)
Specificity of amino acid acylases.
J. Biol. Chem. 194, 455-470

Bloom, G.D., Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1972)
Effects of organic mercurials on mammalian pancreatic ß-cells.
Biochem. J. 129, 241-254

Bonanomi, L., Gazzaniga, A. (1980)
Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine.
Eur. J. Respir. Dis. 61, Suppl. 111, 45-51

Breen, K.J., Bury, R.W., Desmond, P.V., Forge, B.H., Mashford, M.L., Whelan, G. (1982)
Paracetamol self-poisoning: diagnosis, management, and outcome.
Med. J. Aust. 1, 77-79

Brisson, G.R., Malaisse-Lagae, F., Malaisse, W.J. (1972)
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: VII. A proposed site of action for adenosine-3',5'-cyclic monophosphate.
J. Clin. Invest. 51, 232-241

Brock, N., Pohl, J., Stekar, J., Scheet, W. (1982)
Studies on the urotoxicity of oxazaphosphorine cytostatics and its prevention. III. Profile of action of sodium 2-mercaptoethane sulfonate (mesna).
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 18, 1377-1387

Bürgi, H. (1974)
Die mukolytische Wirkung von Mesna.
Anaesthesist 29, 394-397

Capito, K., Hedeskov, C.J. (1976)
Inosine-stimulated insulin release and metabolism of inosine in isolated mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 158, 335-340

Capito, K., Hedeskov, C.J. (1977)
Effects of glucose, glucose metabolites and calcium ions on adenylate cyclase activity in homogenates of mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 162, 569-573

Charles, M.A., Lawecki, J., Pictet, R., Grodsky, G.M. (1975)
Insulin secretion. Interrelationships of glucose, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and calcium.
J. Biol. Chem. 250, 6134-6140

Chodosh, S. (1980)
Acetylcysteine in chronic bronchitis.
Eur. J. Respir. Dis. (Suppl.) 111, 90-92

Cikryt, P. (1979)
Diplomarbeit
Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Tübingen

Coore, H.G., Randle, P.J. (1964)
Regulation of insulin secretion studied with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro.
Biochem. J. 93, 66-78

Crawhall, J.C., Segal, S. (1967)
The intracellular ratio of cysteine and cystine in various tissues.
Biochem J. 105, 891-896

Curry, D.L., Bennett, L.L., Grodsky, G.M. (1968a)
Requirement for calcium ion in insulin secretion by the perfused rat pancreas.
Am. J. Physiol. 214, 174-178

Curry, D.L., Bennett, L.L., Grodsky, G.M. (1968b)
Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas.
Endocrinology 83, 572-584

Dethmers, J.K., Meister, A. (1981)
Glutathione export by human lymphoid cells: Depletion of glutathione by inhibition of its synthesis decreases export and increases sensitivity to irradiation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7492-7496

Dorn, A., Koch, G., Kohnert, K.-D., Ansorge, S., Zühlke, H., Arlt, B., Lorenz, D. (1978)
The immunohistochemical demonstration of the Thiol: proteindisulfid oxidoreductase (TPO) in pancreas and isolated Langerhans' islets. A light-, fluorescent- and electron microscopic study.
Acta histochem. 62, 200-208

Ellman, G.L. (1959)
Tissue sulfhydryl groups.
Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77

Enz, G. (1984)
Dissertation
Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Tübingen

Eriksson, S., Askelöf, P., Axelsson, K., Mannervik, B. (1974)
Evidence for a glutathione-dependent interconversion of two forms of a thioltransferase from rat liver catalyzing thioldisulfide interchange.
Acta Chem. Scand. B 28, 931-936

Erlichman, J., Schubart, U., Fleischer, N. (1979)
Sulfhydryl reagent-induced insulin release and $^{45}Ca^{2+}$ fluxes in Syrian hamster insulinoma cells.
Endocrinology 105, 1183-1190

Fahey, R.C. (1977)
Biologically important thiol-disulfide reactions and the role of cyst(e)ine in proteins: An evolutionary perspective.
In: Protein Crosslinking, ed. by M. Friedman, Plenum Press, New York, Part A, pp. 1-30

Finkelstein, J.P., Kyle, W.E., Harris, B.J., Martin, J.J. (1982)
Methionine metabolism in mammals: Concentration of metabolites in rat tissues.
J. Nutr. 112, 1011-1018

Flohe, L., Günzler, W.A. (1976)
Glutathione-dependent enzymatic oxidoreduction reactions.
In: Glutathione: Metabolism and Function, Kroc Foundation Series, ed. by I.M. Arias and W.B. Jakoby, Ravens Press, New York, Vol. 6, pp. 17-34

Formby, B., Capito, K., Egeberg, J., Hedeskov, C.J. (1976)
Ca-activated ATPase activity in subcellular fractions of mouse pancreatic islets.
Am. J. Physiol. 230, 441-448

Frankel, B.J., Kromhout, J.A., Imagawa, W., Landahl, H.D., Grodsky, G.M. (1978)
Glucose-stimulated Ca-45 uptake in isolated rat islets.
Diabetes 27, 365-369

Freedman, R.B. (1979)
How many enzymes are responsible for the several cellular procresses involving thiol/protein-disulfide interchange?
FEBS Lett. 97, 201-210

Gagliardino, J.J., Harrison, D.E., Christie, M.R., Gagliardino, E.E., Ashcroft, S.J.H. (1980)
Evidence for the participation of calmodulin in the stimulus-secretion coupling in the pancreatic ß-cell.
Biochem. J. 192, 919-927

Gazzard, B.G., Hughes, R.D., Portmann, B., Dordoni, B., Williams, R. (1974)
Protection of rats against the hepatotoxic effect of paracetamol.
Brit. J. Exp. Path. 54, 601

Gilbert, H.F. (1982)
Biological disulfides: The third messenger? Modulation of phosphofructokinase activity by thiol/disulfide exchange.
J. Biol. Chem. 257, 12086-12091

Grassetti, D.R. (1969)
Some biochemical effects of thione-forming disulfides and their use in the study of cell thiols.
Ann. Ist. Super. Sanita 5, 645-651

Greenberg, D.M. (1975)
Biosynthesis of cysteine and cystine.
In: Metabolic pathways, Vol. VII: Metabolism of sulfur compounds. Green, D.M. (ed.), Academic Press, New York, pp. 505-528

Griffith, O.W., Meister, A. (1979)
Potent an specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (s-n-butyl homocysteine sulfoximine).
J. Biol. Chem. 254, 7558-7560

Griffith, O.W., Novogrodsky, A., Meister, A. (1979)
Translocation of glutathione from lymphoid cells that have markedly different γ-glutamyl transpeptidase activities.
FEBS Lett. 108, 335-340

Grodsky, G.M., Batts, A.A., Bennett, L.L., Vcella, C., McWilliams, N.B., Smith, D.F. (1963)
Effects of carbohydrates on secretion of insulin from isolated rat pancreas.
Am. J. Physiol. 205, 638-644

Grodsky, G.M., Bennett, L.L. (1966)
Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas.
Diabetes 15, 910-913

Grodsky, G.M., Curry, D.L., Bennett, L.L., Rodrigo, J.J. (1968)
Factors influencing different rates of insulin release in vitro.
In: Mechanism and Regulation of Insulin Secretion, ed. by R. Levine and E.E. Pfeiffer
Acta Diabetol. Lat. 5, Suppl. 1, 140-161

Hahn, R., Oberrauch, W. (1978)
Unidirectional transport of reduced glutathione in rat liver and its metabolization in the extracellular space.
In: Functions of Glutathione in Liver and Kidney, ed. by H. Sies and A. Wendel, Springer-Verlag, New York, pp. 32-40

Hahn, H.-J., Gylfe, E., Hellman, B. (1980)
Calcium and pancreatic ß-cell function: 7. Evidence for cyclic AMP-induced translocation of intracellular calcium.
Biochim. Biophys. Acta 630, 425-432

Hanks, J.H., Wallace, E.R. (1949)
Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissue by refrigeration.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, 196-200

Harding, J.J. (1969)
Glutathione protein mixed disulfides in human lens.
Biochem J. 114, 88-89

Harrap, K.R., Jackson, R.C., Riches, P.G., Smith, C.A., Hill, B.T. (1973)
The occurence of protein-bound mixed disulfides in rat tissues.
Biochim. Biophys. Acta 310, 104-110

Hedeskov, C.J., Capito, K. (1974)
The effect of starvation on insulin secretion and glucose metabolism in mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 140, 423-433

Hedeskov, C.J., Capito, K., Thams, P. (1983)
Effects of glucose and other secretagogues on the cytosolic ratios of free NADH/NAD^+ and free NADPH/$NADP^+$ in mouse pancreatic islets.
Diabetologia 25, 163 (Abstr. 164)

Heinle, H., Sawatzki, G., Wendel, A. (1976)
Glutathionbiosynthese. VII. Die Biosynthese von Glutathion in Humanerythrocyten.
Hoppe-Seyler's Zeit., Physiolog. Chem. 357, 1451

Hellerström, C. (1964)
Method for microdissection of intact pancreatic islets of mammals.
Acta Endocrinol. (Kbh) 45, 122-132

Hellerström, C., Gunnarsson, R. (1970)
Bioenergetis of islet function: oxygen utilization and oxidative metabolism in the ß-cells.
Acta Diabetol. Lat. 7, Suppl. 1, 127-158

Hellman, B., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1971a)
Evidence for mediated transport of glucose in mammalian pancreatic ß-cells.
Biochim. Biophys. Acta 241, 147-154

Hellman, B., Sehlin, J., Täljedahl, I.-B. (1971b)
Stereospecific glucose uptake by pancreatic ß-cells.
Horm. Metab. Res. 3, 219-220

Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1973a)
Iodoacetamide-induced senitization of pancreatic B-cells to glucose stimulation.
Biochem. J. 132, 775-789

Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1973b)
Role of thiol groups in insulin release: Studies with poorly permeating disulphides.
Mol. Pharmacol. 9, 792-801

Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1974a)
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues: VIII. Comparisons of glucose with glyceraldehyde isomers and dihydroxyacetone.
Archs. Biochem. Biophys. 162, 448-457

Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1974b)
Membrane sulphydryl groups and the pancreatic beta cell recognition of insulin secretagogues.
In: Diabetes (eds. Malaisse, W.J., Pirat, J.)
Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 65-78

Hellman, B., Sehlin, J., Söderberg, M., Täljedal, I.-B. (1975a)
The mechanism of action of chloromercuribenzene-p-sulphonic acid as insulin secretagogue: Fluxes of calcium, sodium and rubidium in islets exposed to mercurial and a membraneactive antagonist.
J. Physiol. London 252, 701-712

Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1975b)
Stimulation of insulin release by thiols.
Biochim. Biophys. Acta 392, 101-109

Hellman, B. (1976)
Effects of starvation and Ca^{2+} on glucose-induced accumulation of cyclic 3',5'-AMP in pancreatic islets.
Experientia 32, 155-157

Hellman, B., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1976)
Effects of glucose on $^{45}Ca^{2+}$ uptake by pancreatic islets as studied with the lanthanum method.
J. Physiol. London 254, 639-656

Henquin, J.C. (1977)
Tetraethylammonium potentiation of insulin release and inhibition of rubidium efflux in pancreatic islets.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 551-556

Henquin, J.C. (1978a)
Metabolic control by sugars of the potassium permeability (PK) of pancreatic islets cells.
Diabetologia 15, 239

Henquin, J.C. (1978b)
D-glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islet cells.
Nature 271, 271-273

Henquin, J.C., Meissner, H.P. (1978)
Valinomycin inhibition of insulin release and alteration of the electrical properties of pancreatic ß-cells.
Biochim. Biophys. Acta 543, 455-464

Henquin, J.C. (1980)
Metabolic control of the potassium permeability in pancreatic islet cells.
Biochem. J. 186, 541-550

Henquin, J.C. (1981)
Effects of trifluoperazine and pimozide on stimulus secretion coupling in the pancreatic ß-cells.
Biochem. J. 196, 771-780

Higashi, T., Tateishi, N., Naruse, A., Sakamoto, Y. (1977)
A novel physiological role of liver glutathione as a reservoir of L-cysteine.
J. Biochem. 82, 117-124

Holmgren, A., (1983)
The glutaredoxin system.
In: Funktions of Glutathione. Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects, ed. by A. Larsson et al., Raven Press, New York, pp. 199-203

Howell, S.L., Montague, W. (1975)
Regulation by nucleotides of ^{45}calcium uptake in homogenates of rat islets of Langerhans.
FEBS Lett. 52, 48-52

Howell, S.L., Tyhurst, M. (1982)
Microtubules, microfilaments and insulin secretion.
Diabetologia 22, 301-308

Hutton, J.C., Penn, E.J., Jackson, P., Hales, C.N. (1981)
Isolation and characterization of calmodulin from an insulin-secreting tumor.
Biochem. J. 193, 875-885

Isaacs, I., Binkley, F. (1977)
Glutathione dependent control of protein disulfide-sulfhydryl content by subcellular fractions of hepatic tissue.
Biochim. Biophys. Acta 497, 192-204

Jain, K., Logothetopoulos, J., Zucker, P. (1975)
The effects of D- and L-glyceraldehyde on glucose oxidation, insulin secretion and insulin biosynthesis by pancreatic islets of the rat.
Biochim. Biophys. Acta 399, 384-394

Jellum, E., Skredes, P. (1976)
Biological aspects of thiol-disulfid reactions during treatment with penicillamine.
In: Penicillamine research in rheumatic disease.
Oslo 1976, pp. 68-79

Jocelyn, P.C. (1972)
Biochemistry of the SH-Group.
Academic Press, London, New York

Keen, H., Sells, R., Jarrett, R.J. (1965)
A method for the study of the metabolism of isolated mammalian islets of Langerhans and some preliminary results.
Diabetologia 1, 28-32

Kohnert, K.-D., Ansorge, S., Dorn, A., Kansy, H., Prehl, C., Zühlke, H. (1977)
Immunohistochemische und biochemische Untersuchungen der Thiol-Proteinsulfid-Oxidoreduktase (TPOR) der Langerhansschen Inseln des Pankreas.
IX. Karlsburger Symposium über Diabetesfragen. Zentralinstitut für Diabetes Karlsburg. Selbstverlag

Kosower, N.S., Kosower, E.M., Wertheim, B., Correa, W.S. (1969)
Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 593-596

Kosower, E.M., Correa, W., Kinon, B.J., Kosower, N.S. (1972)
Glutathione. VII. Differentiation among substrates by the thiol oxidizing agent diamide.
Biochim. Biophys. Acta 264, 39-44

Kosower, E.M., Kosower, N.S., Kanety-Londner, H., Levy, L. (1974)
Glutathione. IX. New thiol-oxidizing agents: DIP, DIP^{+}, DIP^{2+}.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 347-351

Kosower, E.M., Kanety-Londner, H. (1976)
Glutathione. XIII. Mechanism of thiol oxidation by diazene-dicarboxylic acid derivatives.
Am. Chem. Soc. 98, 3001-3007

Kosower, N.S., Kosower, E.M. (1978)
The glutathione status of cells.
Int. Rev. Cytol. 54, 109-160

Kosower, N.S., Zipser, Y., Faltin, Z. (1982)
Membrane thiol-disulfide status in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells. Relationship to cellular glutathione.
Biochim. Biophys. Acta 691, 345-352

Kosower, N.S., Kosower, E.M. (1983)
Glutathione and cell membrane thiol status.
In: Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects, ed. by A. Larsson et al., Ravens Press. New York, pp. 307-315

Krausz, Y., Wollheim, C.B., Siegel, E., Sharp, G.W.G. (1980)
Possible role for calmodulin in insulin release: Studies with trifluoperazine in rat pancreatic islets.
J. Clin. Invest. 66, 603-607

Lacy, P.E. (1961)
Electron microscopy of the ß-cell of the pancreas.
Am. J. Med. 31, 851-859

Lacy, P.E., Kostianovsky, M. (1967)
Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.
Diabetes 16, 35-39

Lacy, P.E., Howell, S.L., Young, D.A., Fink, C.J. (1968)
New hypothesis of insulin secretion.
Nature 219, 1177-1179

Lacy, P.E., Walker, M.M., Fink, C.J. (1972)
Perifusion of isolated rat islets in vitro. Participation of the microtubular system in the biphasic release of insulin.
Diabetes 21, 987-998

Landgraf-Leurs, M.M.C., Mayer, L., Landgraf, R. (1978)
Sulphydryl requirement for insulin release from the perfused pancreas. Studies with ethacrynic acid and dithiothreitol.
Diabetologia 15, 337-342

Lebsanft, J. (1983)
Diplomarbeit
Fakultat für Chemie und Pharmazie, Universität Tübingen

Levin, R.M., Weiss, B. (1977)
Binding of trifluoperazine to the calcium-dependent activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase.
Mol. Pharmacol. 13, 690-697

Luthman, M., Eriksson, S., Holmgren, A., Thelander, L. (1979)
Glutathione-dependent hydrogen donor system for calf thymus ribonucleoside-diphosphate reductase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2158-2162

Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Mayhew, D. (1967)
A possible role for the adenylatcyclase system in insulin secretion.
J. Clin. Invest. 46, 1724-1734

Malaisse, W.J., Lea, M.A., Malaisse-Lagae, F. (1968)
The effect of mannoheptulose on the phosphorylation of glucose and the secretion of insulin by islets of Langerhans.
Metabolism 17, 126-132

Malaisse-Lagae, F., Malaisse, W.J. (1971)
Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. III. Uptake of ^{45}calcium by isolated islets of Langerhans.
Endocrinology 88, 72-80

Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Walker, M.O., Lacy, P.E. (1971)
The stimulus-secretion coupling of glucose induced insulin release: V. The participation of a microtubular-microfilamentous system.
Diabetes 20, 257-265

Malaisse, W.J., Hager, D.L., Orci, L. (1972)
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: IX. The participation of the beta cell web.
Diabetes 21 (Suppl. 2), 594-604

Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Van Obberghen, E., Somers, G., Devis, G., Ravazzola, M., Orci, L. (1975)
Role of microtubules in the phasic pattern of insulin release.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 253, 630-652

Malaisse, W.J., Herchuelz, A., Levy, J., Sener, A., Pipeleers, D.G., Devis, G., Somers, G., Van Obberghen,E. (1976a)
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XIX. The insulinotropic effect of glyceraldehyde.
Mol. Cell. Endocrinol. 4, 1-2

Malaisse, W.J., Sener, A., Koser, M., Herchuelz, A. (1976b)
Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Metabolism of α-and ß-D-glucose in isolated islets.
J. Biol. Chem. 251, 5936-5943

Malaisse, W.J. (1977)
Calcium fluxes and insulin release in pancreatic islets.
Biochem. Soc. Trans. 5, 872-875

Malaisse, W.J., Sener, A., Boschero, A.C., Kawazu, S., Devis, G., Somers, G. (1978a)
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Cationic and secretory effects of menadione in the endocrine pancreas.
Eur. J. Biochem. 87, 111-120

Malaisse, W.J., Hutton, J.C., Kawazu, S., Sener, A. (1978b)
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Metabolic effects of menadione in isolated islets.
Eur. J. Biochem. 87, 121-130

Malaisse, W.J., Hutton, J.C., Kawazu, S., Herchuelz, A., Valverde, I., Sener, A. (1979)
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: XXXV. The links between metabolic and cationic events.
Diabetologia 16, 331-341

Mannervik, B., Axelsson, K. (1978)
The roles of glutathione, thioltransferase and glutathione reductase in the scisson of sulfur-sulfur bonds.
In: Functions of Glutathione in Liver and Kidney, ed. by H. Sies and A. Wendel, Springer-Verlag, pp. 148-153

Mannervik, B., Axelsson, K. (1980)
Role of cytoplasmic thioltransferase in cellular regulation by thiol-disulfide interchange.
Biochem. J. 190, 125-130

Mark, M. (1983)
Dissertation
Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Tübingen

Martindale: The Extra Pharmacopoeia, 28. Edition (1982)
Reynolds, J.E.F., Prasad, A.B. (eds.)
The Pharmaceutical Press, London

Matschinsky, F.M., Ellerman, J.E. (1973)
Dissociation of the insulin releasing and the metabolic functions of hexoses in islets of Langerhans.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 193-199

Matschinsky, F.M., Ellerman, J., Stillings, S., Raybaud,F., Pace, C., Zawalich, W. (1975a)
Hexoses and insulin secretion.
In: Handbook of Experimental Pharmacology, ed. by A. Hasselblatt and F. von Bruchhausen. Berlin: Springer Vol. XXXII/2 (New Ser.) 79-114

Matschinsky, F.M., Pagliari, A.S., Hover, B.A., Haymond, M.W., Stillings, S.N. (1975b)
Differential effects of alpha- and beta-D-glucose on insulin and glucagon secretion from the isolated perfused rat pancreas.
Diabetes 24, 369-372

Matthews, E.K., Sakamoto, Y. (1975)
Pancreatic islet cells: Electrogenic and electrodiffusional control of membrane potential.
J. Physiol. London 246, 439-457

Meissner, H.P. (1976)
Electrical characteristics of the ß-cells in pancreatic islets.
J. Physiol. Paris 72, 757-767

Meister, A. (1975)
Biochemistry of glutathione.
In: Metabolism of Sulfur Compounds, 3. Edition, ed. by D.M. Greenberg, pp. 101-188, Academic Press, New York

Meister, A., Tate, S.S. (1976)
Glutathione and related γ-glutamyl compounds: Biosynthesis and utilization.
Annual Rev. Biochem. 45, 559-604

Meister, A. (1978)
Current status of the γ-glutamyl cycle.
In: Funktions of Glutathione in Liver and Kidney, ed. by H. Sies and A. Wendel, Springer Verlag, pp. 43-59

Meister, A., Griffith, O.W., Novogrodsky, A., Tate, S.S. (1980)
New aspects of glutathione metabolism and translocation in mammals.
In: Sulphur in Biology, CIBA Foundation Symposium 72 (new series), Excerpta Medica, pp. 135-161

Meister, A., (1981)
Metabolism and functions of glutathione.
TIBS, 231-234

Meister, A. (1983)
Metabolism and transport of glutathione and other γ-glutamyl compounds.
In: Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects, ed. by A. Larsson et al., Ravens Press, New York, pp. 1-22

Meredith, M.J., Reed, D.J. (1982)
Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte.
J. Biol. Chem. 257, 3747-3753

Milner, R.D.G., Hales, C.N. (1968)
Cations and the secretion of insulin
Biochim. Biophys. Acta 150, 165-167

Modig, H.G. (1968)
Cellular mixed disulphides between thiols and proteins and their possible implication for radiation protection.
Biochem. Pharmacol. 17, 177-186

Modig, H.G., Edgren, M., Revesz, L. (1972)
Release of thiols from cellular mixed disulphides and its possible role in radiation protection.
Int. J. Radiat. Biol. 22, 257-268

Montague, W., Howell, S.L., Green, I.C. (1976)
Insulin release and microtubular system of the islets of Langerhans. Effects of insulin secretagogues on microtubule subunit pool size.
Horm. Metab. Res. 8, 166-169

Morin, J.E., Kent, A., Dixon, J.E. (1983)
Purification of thiol protein disulfide oxidoreductases and possible biological functions.
In: Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects, ed. by. A. Larsson et al., Ravens Press, New York, pp. 285-295

Moskalewski, S. (1965)
Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig.
Gen. Comp. Endocrinol 5, 342-353

Munthe, E., Guldal, G., Jellum, E. (1979)
Increased intracellular glutathione during penicillamine treatment for rheumatoid arthritis.
Lancet 2, 1126-1127

Niki, A., Niki, H., Miwa, I., Okuda, J. (1974)
Insulin secretion by anomers of D-glucose.
Science 186, 150-151

Pace, C.S., Ellerman, J.E., Hover, B.A., Stillings, S.N., Matschinsky, F.M. (1975)
Multiple metabolic functions of glucose in rat pancreatic islets.
Diabetes 24, 476-488

Pagliara, A.S., Hover, B.A., Ellerman, J., Matschinsky, F.M. (1975)
Iodoacetate and iodoacetamide-induced alterations of pancreatic α-and ß-cell responses.
Endocrinology 97, 698-708

Palmer, K.N.V., Geake, M.R., Brass, W. (1962)
Clinical trial of methyl cysteine hydrochloride in chronic bronchitis.
Brit. Med. J., 280-282

Panten, U., Christians, J., v. Kriegstein, E., Poser, W., Hasselblatt, A. (1973)
Effect of carbohydrates upon fluorescence of reduced pyridine nucleotides from perifused isolated pancreatic islets.
Diabetologia 9, 477-482

Panten, U., Christians, J., v. Kriegstein, E., Poser, W., Hasselblatt, A. (1974)
Studies on the mechanism of L-Leucine- and α-Ketoisocaproic acid-induced insulin release from perfused isolated pancreatic islets.
Diabetologia 10, 149-154

Prescott, L.F. (1981)
Treatment of severe acetaminophen poisoning with intravenous acetylcysteine.
Arch. Intern. Med. 141, 386-389

Puri, R.N., Meister, A. (1983)
Transport of glutathione, as γ-glutamylcysteinglycylester into liver and kidney.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5258-5260

Randle, P.J., Ashcroft, S.J.H., Gill, J.R. (1968)
Carbohydrate metabolism and release of hormones.
In: Carbohydrate Metabolism and Its Disorders, ed. by F. Diekens, P.J. Randle and W.J. Whelan
London: Academie, vol. 1, 427-447

Reed, D.J., Beatty, P.W. (1978)
The role of the cystathione pathway in glutathione regulation by isolated hepatocytes.
In: Functions of Gluthione in Liver and Kidney, ed. by H. Sies and A. Wendel, Springer-Verlag, New York, pp. 13-21

Reed, D.J., Brodie, A.E., Meredith, M.J. (1983)
Cellular heterogeneity in the status and functions of cysteine and glutathione.
In: Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects, ed. by A. Larsson et al., Ravens Press, New York, pp. 39-49

Richman, P.G., Meister, A. (1975)
Regulation of γ-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione.
J. biol. Chem. 250, 1422-1426

Rink, H. (1974)
Thiol compounds in radiation biology.
In: Glutathione. Proc. of the 16th conference of the german society of biological chemistry. Eds. L. Flohe, R.C. Benöhr, H. Siess, H.D. Walter, A. Wendel, Georg Thiema Verlag Stuttgart, New York

Sams, D.J., Montague, V. (1972)
The role of adenosine-3',5'-cyclic monophosphate in the regulation of insulin release. Properties of islet-cell adenosine-3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase.
Biochem. J. 129, 945-952

Scheffner, A.L. (1963)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 106, 298-310

Schubart, U.K., Erlichman, J., Fleischer, N. (1980)
The role of calmodulin in the regulation of protein phosphorylation and insulin release in hamster insulinoma cells.
J. Biol. Chem. 255, 4120-4124

Sehlin, J. (1976)
Calcium uptake by subcellular fractions of pancreatic islets. Effects of nucleotides and theophylline.
Biochem. J. 156, 63-69

Sener, A., Hutton, J.C., Kawazu, S., Boschero, A.C., Somers, G., Devis, G., Herchuelz, A., Malaisse, W.J. (1978)
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Metabolic and functional effects of NH_4^+ in rat islets.
J. Clin. Invest. 62, 868-878

Sharp, G.W.G., Wollheim, C., Müller, W.A., Gutzeit, A., Truehart, P.A., Blondel, B., Orci, L., Renold, A.E. (1975)
Studies on the mechanism of insulin release.
Fed. Proc. 34, 1537-1548

Sies, H., Gerstenecker, C., Menzel, H., Flohe, L. (1972)
Oxidation in the NADP system and release of GSSG from hemoglobinfree perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathione by hydroperoxides.
FEBS Lett. 27, 171-175

Skondia, V. (1983)
Mistrabronco^{R} (Mesna)
Wissenschaftl. Publikation, hrsg. von UCB-Chemie, Kerpen (Deutschland)

Snyder, P.J., Kaskhet, S., O'Sullivan, J.B. (1970)
Pentose cycle in isolated islets during glucose-stimulated isnulin release.
Am. J. Physiol. 219, 876-880

Soeldner, J.S., Slone, D. (1965)
Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin using the double antibody technique.
Diabetes 14, 771-779

Srivastava, S.K., Awashti, Y.C., Beutler, E. (1974)
Useful agents for the study of glutathione metabolism in erythrocytes-organic hydroperoxides.
Biochem. J. 139, 289-295

Strölin, W. (1983)
Dissertation
Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Tübingen

Sugden, M.C., Ashcroft, S.J.H. (1977)
Phosphoenolpyruvate in rat pancreatic islets: A possible intracellular trigger of insulin release.
Diabetologia 13, 481-486

Sugden, M.C., Ashcroft, S.J.H. (1978)
Effects of phosphoenolpyruvate, other glycolytic intermeditates and methylxanthines on calcium uptake by a mitochondrial fraction from rat pancreatic islets.
Diabetologia 15, 173-180

Sugden, M.C., Ashcroft, S.J.H., Sugden, P.H. (1979a)
Proteinkinase activities in rat pancreatic islets of Langerhans.
Biochem. J. 180, 219-229

Sugden, M.C., Christie, M.R., Ashcroft, S.J.H. (1979b)
Presence and possible role of calcium-dependent regulator (calmodulin) in rat islets of Langerhans.
FEBS Lett. 105, 95-100

Sugden, M.C., Ashcroft, S.J.H. (1981)
Cyclic nucleotide phosphodiesterase of rat pancreatic islets. Effects of Ca^{2+}, Calmodulin and trifluoperazine.
Biochem. J. 197, 459-464

Tateishi, N., Higashi, T., Shinya, S., Naruse, A., Sakamoto, Y. (1974)
Studies on the regulation of glutathione level in rat liver.
J. Biochem. 75, 93-103

Tateishi, N., Higashi, T., Naruse, A., Nakoshima, K., Shiozaki, H., Sakamoto, Y. (1977)
Rat liver glutathione: Possible role as a reservoir of cysteine.
J. Nutr. 107, 51-58

Tateishi, N., Higashi, T. (1978)
Turnover of glutathione in rat liver.
In: Functions of Glutathione in Liver and Kidney, ed. by H. Sies and A. Wendel, Springer-Verlag, New York, pp. 3-7

Tateishi, N., Higashi, T., Naruse, A., Hikita, K., Sakomoto, Y. (1981)
Relative contributions of sulfur atoms of dietary cysteine and methionine to rat liver glutathions and proteins.
J. Biochem. 90, 1603-1610

Tomlinson, S., Walker, S.W., Brown, B.L. (1982)
Calmodulin and Insulinsecretion.
Diabetologia 22, 1-5

Umbreit, W.W., Burris, R.H., Stauffer, J.P. (1972)
Manometric and biochemical techniques.
5th edition, Burgess Publ. Co., Minneapolis, USA, p. 146

Valverde, I., Vandermeers, A., Anjaneyulu, R., Malaisse, W.J. (1979)
Calmodulin activation of adenylate cyclase in pancreatic islets.
Science 206, 225-227

Valverde, I., Sener, A., Lebrun, P., Herchuelz, A., Malaisse, W.J. (1981)
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: XLVII. The possible role of calmodulin.
Endocrinology 108, 1305-1312

Veech, R.L., Eggleston, L.V., Krebs, H.A. (1969)
The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in the cytoplasma of rat liver.
Biochem. J. 115, 609-619

Verspohl, E.J., Händel, M., Ammon, H.P.T. (1979)
Pentosephosphate shunt activity of rat pancreatic islets: Its dependence on glucose concentration.
Endocrinology 105, 1269-1274

Wahl, M.A. (1984)
Dissertation
Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Tübingen

Weiss, B., Prozialeck, W., Cimino, M., Sellinger Barnette, M., Wallace, T.L. (1980)
In: Calmodulin and cell funktion.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 356, 319-345

Wendel, A., Jaeschke, H., Gloger, M. (1982)
Drug-induced lipid peroxidation in mice. II. Protection against paracetamol-induced liver necrosis by intravenous liposomally-entrapped glutathione.
Biochem. Pharmacol. 31, 3601-3605

Wendel, A., Jaeschke, H. (1982)
Drug-induced lipid peroxidation in mice. III. Glutathione content of liver, kidney and spleen after intravenous administration of free and liposomally-entrapped glutathione.
Biochem. Pharmacol. 31, 3607-3611

Wendel, A., Jaeschke, H. (1983)
Differential hepatoprotection against Paracetamol-induced liver necrosis in mice by free and liposomally-entrapped glutathione.
In: Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects, ed. by A. Larsson et al., Ravens Press, New York, pp. 139-147

Williams, I.H., Ashcroft, S.J.H. (1978)
N-acetylglucosamine and the substrate-site hypothesis for the control of insulin biosynthesis and secretion.
FEBS Lett. 87, 115-120

Williamson, J.M., Meister, A. (1981)
Stimulation of hepatic glutathione formation by administration of L-2-oxothiazolidine-4-carbocylate, a 5-oxo-L-prolinase substrate.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 936-939

Williamson, J.M., Boettcher, B., Meister, A. (1982)
Intracellular cysteine delivery system that protects against toxicity by promoting glutathione synthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6246-6249

Zawalich, W.S., Karl, R.C., Ferrendelli, J.A., Matschinsky, F.M. (1975)
Faktors governing glucose induced elevation of cyclic 3',5'-AMP levels in pancreatic islets.
Diabetologia 11, 231-235

Zawalich, W.S., Pagliari, A.S., Matschinsky, F.M. (1977)
Effects of iodoacetate, mannoheptulose and 3-O-methyl-glucose on the secretory function and metabolism of isolated pancreatic islets.
Endocrinology 100, 1276-1283

Zawalich, W.S., Dye, E.S., Matschinsky, F.M. (1979)
Metabolism and insulin-releasing capabilities of glucosamine and N-acetylglucosamine in isolated rat islets.
Biochem. J. 180, 145-152

L E B E N S L A U F

Am 25. April 1954 wurde ich, Karl-Heinz Hehl, als Sohn des Fabrikarbeiters Emil Hehl und seiner Ehefrau Josefine, geb. Riedlinger, in Rottweil a.N. geboren.

Von April 1961 bis März 1966 besuchte ich die Kath. Volksschule in Schömberg. Danach wechselte ich an das Leibniz-Gymnasium nach Rottweil über, wo ich im Juni 1974 die Reifeprüfung ablegte.

Von Juli 1974 bis Juni 1976 leistete ich als Soldat auf Zeit meinen Wehrdienst ab.

Das Studium der Pharmazie nahm ich im Oktober 1976 an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen auf, wo ich im September 1978 den ersten und im Mai 1980 den zweiten Teil der Pharmazeutischen Prüfung erfolgreich ablegte.

Vom 8. April 1980 bis zum 7. April 1981 absolvierte ich das Pharmaziepraktikum in der Schwarzwald-Apotheke in Zimmern ob Rottweil.

Mit Bestehen des dritten Prüfungsabschnittes am 30. April 1981 und der Erteilung der Approbation am 14. Mai 1981 schloß ich meine Ausbildung zum Apotheker ab.

Im Mai 1981 begann ich am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen bei Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon mit den Arbeiten zur vorliegenden Dissertation, die ich im Februar 1984 abschloß.

Von Juli 1981 bis Dezember 1983 war ich als wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen angestellt.

Seit 3. September 1982 bin ich mit Frau Gabriele Hehl, geb. Pfeiffer, verheiratet.

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon waren die Herren Professoren: H. Auterhoff, K.-A. Kovar, J. Schultz (Pharmazeutische Chemie); E. Graf, H. Hamacher (Pharmazeutische Technologie); E. Reinhard (Pharmazeutische Biologie); E. Lindner (anorgan. Chemie); E. Bayer (organ. Chemie); K. Botzenhart (Medizinische Mikrobiologie); H. Seiler (Physik).